

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Pneumologia Sperimentale e clinica

XXIV Ciclo SSD MED 10

**RUOLO DELL'IL-13 NELLA DESENSIBILIZZAZIONE DEL
RECETTORE β_2 ADRENERGICO NELLE CELLULE EPITELIALI
BRONCHIALI PRIMARIE UMANE**

Candidata

Giusy Daniela Albano

Tutor

Chiar.mo Prof. Vincenzo Bellia

Co-Tutor

Chiar.mo Dott. Giovanni Viegì

Coordinatore

Chiar.ma Prof.ssa Marisa Bonsignore

Anni 2011/2013

Indice	
Abstract	3
Definizione asma	6
Prevalenza, morbilità e mortalità	7
Fattori di rischio	8
Fattori di rischio individuali	8
Predisposizione genetica	9
Fattori di rischio ambientali	9
Meccanismi patogenetici	11
Infiammazione delle vie aeree nell'asma	11
Cellule infiammatorie	11
I cambiamenti strutturali delle vie aeree	13
Iperreattività bronchiale	14
Fenotipo	14
Fenotipo infiammatorio Th2	15
Trattamento dell'asma	15
Corticosteroidi inalatori	16
Antileucotrieni	16
β 2-agonisti orali a lunga durata d'azione	17
β 2-agonisti inalatori a lunga durata d'azione	17
β 2-agonisti inalatori rapidi e β 2-agonisti orali a breve durata d'azione	18
Recettore β 2-adrenergico	18
Struttura recettoriale	18
Attivazione del recettore e trasduzione del segnale	19
Desensibilizzazione recettoriale	21
15-Lipossigenasi 1	23
PEBP1 e GRK-2	24
Obiettivi dello studio	29
Materiali e metodi	30
Pazienti	30
Cellule epiteliali bronchiali in colture ALI (air-liquid-interface)	31

Western Blot	33
Co-Immunoprecipitazione	33
Silenziamento genico siRNA	34
cAMP assay	35
Analisi statistica dei risultati	35
Risultati	37
Discussione	45
Bibliografia	52

IL-13 induced β 2-adrenergic receptor (β 2-AR) desensitization in human airway epithelial cells.

G.D. Albano^{1, 2, 4}, J. Zhao¹, M. Profita², A. Sala³, JB Trudeau¹, S.E. Wenzel¹.

¹ University of Pittsburgh Asthma Institute, Division of Pulmonary, Allergy and Critical Care Medicine, Department of Medicine, University of Pittsburgh, PA, USA.

² Institute of Biomedicine and Molecular Immunology, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Palermo, Italy

³ Department of Pharmacological Sciences, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

⁴ Dipartimento Biomedico di Medicina, Interna e Specialistica (Di.Bi.M.I.S.), Sezione di Pneumologia, Scuola di Dottorato in Pneumologia, Sperimentale e clinica, University of Palermo, Italy

Rationale

β 2-AR is a prototypical G-protein coupled receptor (GPCR), which has a critical role in airway smooth muscle relaxation and bronchodilation. However, this receptor also plays a role in epithelial function, in particular controlling ciliary beat, serous stimulation, mucous secretion and lung fluid clearance. β -AR desensitization as consequence of β -agonist therapy can lead to diminish bronchodilator effects, but effects on epithelial cells are less clear. G-protein receptor kinases (GRK) play an important role in GPCR regulation by phosphorylating agonist-occupied receptors to promote their internalization and desensitization. GRK2 has been implicated in β 2-AR desensitization. However, little is known regarding the role or mechanisms by which adaptive immunity may regulate the β 2 receptor.

Hypothesis

IL-13 induces β 2-adrenergic receptor desensitization in human airways epithelial cell by inducing GRK2 phosphorylation, which leads to phosphorylation of the β 2-AR and promotion of receptor internalization and desensitization.

Material and Methods

Primary human bronchial epithelial cells (HBEC) from bronchial brushings of normal and asthmatic subjects were cultured in air-liquid interface (ALI). Cells were pretreated with without IL-13 (10ng/ml) for 48 hours and then stimulated or with/without isoproterenol (ISO) (1 μ M) for 30 minutes prior to harvest. GRK2 and β 2-AR phosphorylation were detected by western blot on HBEC lysates. As the data were not normally distributed, the Kruskal-Wallis test for multiple comparisons was used, with Spearman's rho for correlations. The results were expressed as median and 25th -75th percentiles.

Results

IL-13 and ISO increased GRK2 phosphorylation ($p=0.02$ for IL-13 and $p=0.04$ for ISO). IL-13 and ISO also increased β 2-AR phosphorylation ($p=0.03$ for IL-13, $p=0.06$ for ISO). Interestingly, IL-13 stimulation in combination with ISO also increased GRK2 phosphorylation as compared to media control ($p=0.03$), but more importantly also tended to increase GRK2 phosphorylation as compared to treatment with either IL-13 alone (147% (69-200%, $p=0.09$) or ISO alone (143% (78-143%, $p=0.3$), although in small numbers this was not significant. Like GRK2, IL-13 stimulation in combination with ISO increased β 2-AR phosphorylation as compared to media control ($p=0.01$) or ISO alone (235% (0.93-5.16, $p=0.03$). β 2-AR phosphorylation also tended to increase with the combination of IL-13 and ISO as compared to IL-13 alone (129% (0.62-1.53%) compared to IL-13) although in small numbers this was not significant.

Conclusion

IL-13 appears to play a significant role in the regulation of β 2-AR desensitization through an effect on activation of GRK2. This effect augments the phosphorylation observed with a β -agonist alone, which may alter epithelial responses to β 2-agonists in asthmatic patients with a Th2 phenotype.

Sources of support: NIH AI-40600-15 (SEW): CTSI UL-1-RR02415E (SEW) and American Heart Association grant 0825556D (JZ)

DEFINIZIONE ASMA

Secondo le più recenti linee guida del gruppo di lavoro GINA (Global Initiative for Asthma), che opera in collaborazione con l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), l'asma bronchiale è *“una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree, in cui svolgono un ruolo molteplici cellule ed elementi cellulari. L'infiammazione cronica è associata ad iperreattività bronchiale, episodi ricorrenti di respiro sibilante, dispnea, senso di costrizione toracica e tosse, in particolare di notte o nelle prime ore del mattino. Questi episodi sono generalmente associati a broncocostrizione, reversibile spontaneamente o dopo trattamento”* [1].

La definizione di asma ha subito notevoli modificazioni negli ultimi anni. Anche importanti riviste cliniche internazionali come “The Lancet” hanno suggerito che il termine asma non è aggiornato e che dovrebbero essere incoraggiate definizioni clinicamente e biologicamente più dettagliate mirate alla descrizione di questa condizione patologica [2]. Tuttavia, studi più meccanicistici sull'asma si concentrano solo su un processo altamente specifico relativo all'infiammazione allergica delle vie aeree, nonostante il fatto che l'importanza generale di questo singolo processo di malattia umana rimane poco compresa.

In passato la malattia veniva definita esclusivamente sulla base della broncocostrizione e dell'iperreattività bronchiale senza considerare i meccanismi patogenetici responsabili della malattia, anche perché questi erano poco conosciuti. Il recente sviluppo di tecniche per la raccolta, l'analisi e la processazione di biopsie bronchiali, lavaggio bronco alveolare ed espettorato indotto, ha aumentato notevolmente le conoscenze sulla patogenesi della malattia e consolidato il concetto che l'infiammazione delle vie aeree rappresenta il motore patogenetico dell'asma. Nelle definizioni più recenti, infatti, le alterazioni cliniche e funzionali sono considerate una conseguenza dell'infiammazione con importanti risvolti nell'approccio diagnostico e terapeutico della malattia.

Dal punto di vista clinico, l'asma si manifesta come una malattia episodica, in cui fasi acute (riacutizzazioni) si possono alternare con periodi sintomatologicamente silenti. Gli attacchi d'asma sono di solito brevi (minuti/ore) e, al termine di ognuno, il paziente risulta sul piano clinico apparentemente guarito. L'asma può manifestarsi anche in forma più grave, con attacchi gravi e frequenti. In questi casi i sintomi possono persistere anche tra un attacco e l'altro. Infine, in un numero molto ridotto di casi, l'asma può ancora oggi risultare fatale.

PREVALENZA, MORBILITÀ E MORTALITÀ

L'asma è un problema di salute di portata mondiale che colpisce circa 300 milioni di persone [3,4]. Malgrado centinaia di rapporti sulla prevalenza dell'asma in popolazioni diverse, la mancanza di una definizione di malattia precisa e universalmente accettata rende difficile il confronto dei dati di prevalenza segnalati in ambito mondiale. Sulla base dell'applicazione di metodi standardizzati per misurare la prevalenza dell'asma e del respiro sibilante nei bambini e negli adulti, la prevalenza dell'asma nel mondo varia tra l'1% e il 18% (Figura 1). Evidenze suggeriscono che le differenze nella prevalenza dei sintomi dell'asma nei vari paesi siano in riduzione, soprattutto nelle classi di età di 13-14 anni, con una riduzione della prevalenza della malattia nell'America settentrionale, nell'Europa occidentale e un aumento nei paesi dove nel passato era inferiore. Malgrado siano stati rilevati minimi cambiamenti della prevalenza di sintomi come respiro sibilante, la percentuale dei bambini che ha manifestato sintomi di asma è aumentata in maniera considerevole, il che riflette una consapevolezza maggiore nei confronti della malattia e un cambiamento nelle capacità di diagnosi. L'aumento della prevalenza dei sintomi dell'asma osservata in Africa, America Latina e in alcune regioni dell'Asia indica che a livello mondiale il problema stia aumentando e che le differenze su scala globale sulla sua prevalenza siano invece in riduzione [5].

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato una perdita per l'asma di circa 15 milioni di anni di vita in buona salute (DALYs: disability adjusted life years = anni di vita corretti per la disabilità), un valore che corrisponde all'1% del carico (burden) globale di malattie [2]. Si stimano circa 250.000 morti per asma/anno in tutto il mondo; la mortalità non sembra correlare con la prevalenza della malattia (Figura 1). Non esistono dati sufficienti per determinare quali cause siano alla base delle variazioni descritte nella prevalenza all'interno di una stessa popolazione e tra popolazioni diverse.

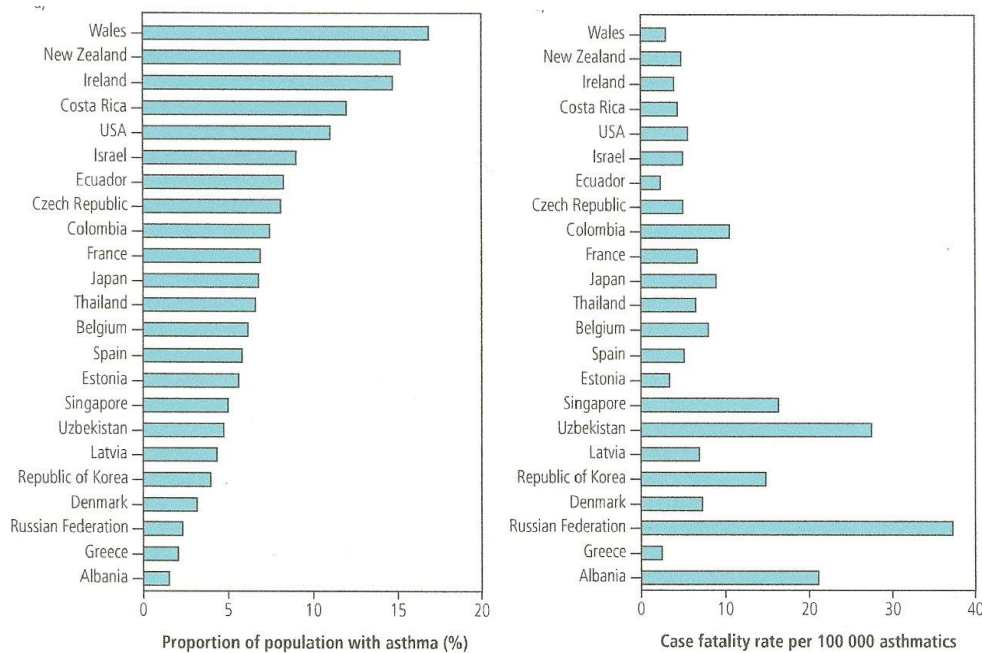


Figura 1. Prevalenza e mortalità nell'asma

FATTORI DI RISCHIO

I fattori di rischio dell'asma bronchiale si possono distinguere in fattori costituzionali o individuali, che predispongono gli individui allo sviluppo di asma, e fattori ambientali, che influenzano la suscettibilità all'insorgenza dell'asma in individui predisposti [6].

I meccanismi attraverso cui questi fattori influenzano lo sviluppo e l'espressione dell'asma sono complessi e interagiscono tra loro.

Numerosi studi hanno evidenziato che il periodo della vita in cui essi intervengono riveste notevole importanza [7,8].

Fattori di rischio individuali

I fattori di rischio individuali sono principalmente rappresentati da: predisposizione genetica, atopia, iperreattività bronchiale, sesso e razza.

Predisposizione genetica

L'asma ha indubbiamente una componente ereditaria, che tuttavia non è semplice da individuare. I dati disponibili confermano che molti geni partecipano alla patogenesi dell'asma [9, 10]: in gruppi etnici diversi possono essere coinvolti geni diversi. La ricerca di geni collegati allo sviluppo di asma ha messo a fuoco alcuni aspetti importanti: la produzione degli anticorpi allergene-specifici IgE (atopia); l'espressione d'iperreattività bronchiale; la produzione di mediatori infiammatori (citochine, chemochine, fattori di crescita); la determinazione del rapporto Th1 e Th2 (relativo all' "ipotesi igienica" dell'asma, la quale suggerisce che l'esposizione precoce alle infezioni possa influenzare lo sviluppo del sistema immunitario in una direzione "non-allergica", il che comporterebbe un rischio minore di sviluppare l'asma e altre malattie allergiche) [11].

Gli studi condotti su famiglie e l'analisi dell'associazione caso-controllo hanno identificato un numero di regioni cromosomiche associate alla suscettibilità per l'asma. La tendenza, ad esempio, a produrre un livello elevato di IgE sieriche totali è ereditata insieme alla predisposizione per l'iperreattività bronchiale, e un gene (o più geni) regolante l'iperreattività bronchiale è situato vicino a quello che regola i livelli di IgE serici sul cromosoma 5q27. Tuttavia, la ricerca di un gene specifico (o di più geni) implicati nella predisposizione all'atopia o all'asma è ancora in corso e i dati al momento disponibili sono relativamente solidi [7,8].

Oltre ai geni che predispongono allo sviluppo dell'asma, ce ne sono alcuni associati alla risposta alla terapia. Ad esempio, le variazioni nel gene che codifica per il beta-adrenorecettore sono associate alle diverse risposte al trattamento con β_2 -agonisti [12] e altri geni modificano la risposta ai glucocorticosteroidi [13] e agli antileucotrieni [14]. Questi marcatori, probabilmente, diventeranno un elemento importante, non solo come fattori di rischio nella patogenesi dell'asma, ma anche come determinanti la risposta al trattamento [12, 15].

Fattori di rischio ambientali

Tra i fattori ambientali, l'esposizione ad allergeni ai quali il soggetto può sensibilizzarsi rappresenta un aspetto fondamentale sia nel favorire lo sviluppo di asma sia nel provocare la

ricomparsa dei sintomi e le riacutizzazioni. La sensibilizzazione a più di un allergene aumenta non solo il rischio di malattia, ma anche la gravità dell'asma.

Esistono, inoltre, altri fattori che possono portare all'insorgenza della malattia; tra questi, l'inquinamento atmosferico sembra rivestire una rilevanza sempre maggiore. L'ambiente di lavoro può inoltre contenere sostanze capaci di sensibilizzare il soggetto esposto e indurre così la comparsa di asma.

Esposizione al fattore scatenante e fenotipo, grado di iperreattività e di ostruzione del flusso d'aria, e severità dell'infiammazione delle vie aeree causano differenti manifestazioni di asma nei pazienti.

Fattori scatenanti

Fattori scatenanti la crisi asmatica sono: fumo di sigaretta; variazioni climatiche; emozioni intense e stress che possono provocare iperventilazione e ipocapnia, con conseguente restringimento delle vie aeree [16]; alcuni alimenti, conservanti alimentari e farmaci (aspirina, mezzi di contrasto e FANS); infezioni delle alte vie respiratorie che aumentano la reattività immune delle basse vie aeree, con rilascio di citochine pro infiammatorie e mediatori infiammatori [17]. Anche l'esercizio fisico costituisce un frequente fattore scatenante le riacutizzazioni asmatiche di breve durata nei bambini e nei giovani [18]. L'ostruzione delle vie aeree da sforzo è determinata dalle alterazioni della mucosa bronchiale indotte dall'iperventilazione, dal raffreddamento, dal riscaldamento, dall'eccitazione dei recettori di stiramento e dalle alterazioni dell'osmolarità del fluido che riveste la mucosa delle vie aeree. Un importante fattore scatenante è il transito per via retrograda di materiale gastrico nell'esofago che, per effetto di un'incontinenza cardiaca, caratteristica del reflusso gastro-esofageo, può riacutizzare l'asma attraverso due distinti meccanismi: irritando la mucosa esofagea con conseguente stimolazione vagale che provoca una risposta riflessa di broncostruzione; oppure il materiale refluito può risalire l'esofago ed essere aspirato in minima quantità nell'albero respiratorio, dando luogo a una risposta irritativa.

MECCANISMI PATOGENETICI

L'asma è una malattia infiammatoria delle vie aeree nella quale sono coinvolte numerose cellule infiammatorie e molti mediatori chimici che comportano cambiamenti fisiopatologici caratteristici. Attraverso meccanismi non ancora del tutto noti, questo modello d'infiammazione è strettamente associato con l'iperreattività bronchiale e con l'insorgenza dei sintomi dell'asma.

Infiammazione delle vie aeree nell'asma

Le manifestazioni cliniche dell'asma sono estremamente variabili e sono stati osservati pattern infiammatori differenti a carico delle vie aeree, ma la presenza di un processo infiammatorio è una caratteristica costante della malattia. L'infiammazione delle vie aeree è presente sempre, anche nelle fasi di quiescenza dei sintomi, ma non è stato definito ancora chiaramente il rapporto fra la severità dell'asma e l'intensità dell'infiammazione [19, 20]. I reperti d'infiammazione sono stati riscontrati in ogni tratto delle vie aeree, con un coinvolgimento, in molti casi, esteso dalle vie aeree inferiori al naso, ma i suoi effetti fisiopatologici si verificano per il coinvolgimento dei bronchi di medie dimensioni. Il modello d'infiammazione sembra paragonabile in tutte le forme cliniche di asma (allergico, non-allergico, indotto da aspirina in diverse fasce d'età).

Cellule infiammatorie

Nell'asma si verifica il pattern d'infiammazione caratteristico delle malattie allergiche, che prevede la presenza di mastociti ed eosinofili attivati, delle cellule in- KT (invariant natural Killer T) e dei linfociti Th2, che a loro volta liberano i mediatori responsabili delle manifestazioni cliniche della malattia. Linfociti T, presenti in un numero elevato nelle vie aeree, rilasciano citochine specifiche (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) che regolano l'infiammazione eosinofila e la produzione di IgE dai linfociti B [21]. Un aumento nell'attività delle cellule Th2 può essere dovuto in parte a una riduzione delle cellule T regolatrici che normalmente inibiscono le cellule Th2, oppure ad un aumento delle cellule in KT, che rilasciano elevate quantità di citochine Th1 e Th2 [22]. Le citochine regolano la risposta infiammatoria

dell'asma e ne determinano il livello di gravità [23]. Fra le citochine più importanti si segnalano IL-1 β e TNF- α , che amplificano la risposta infiammatoria, e GM-CSF, che prolunga la sopravvivenza degli eosinofili nelle vie aeree. Le citochine derivate dai Th2 includono l'IL-5, richiesta per la differenziazione e la sopravvivenza degli eosinofili, IL-4, importante per la differenziazione delle cellule Th2 e l'IL-13, necessaria per formazione di IgE.

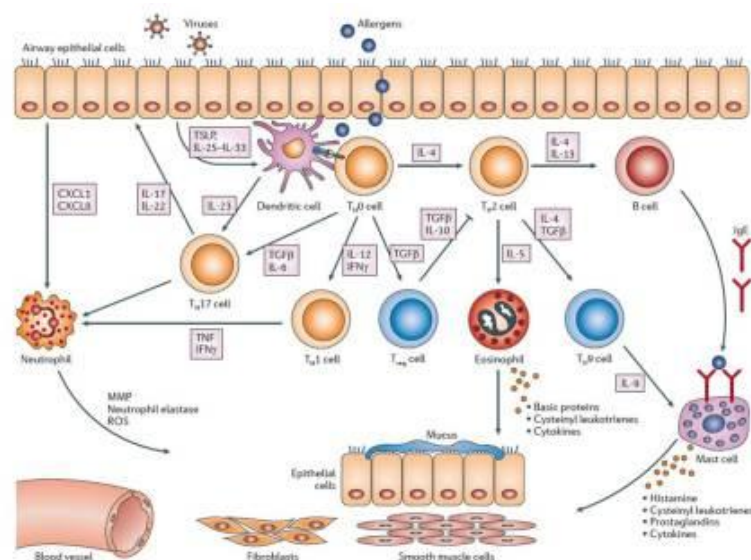


Figura 2. Patobiologia dell'asma.

L'asma origina da interazioni complesse tra fattori genetici e agenti ambientali come aeroallergeni e virus respiratori. In particolare, all'interno del lume delle vie aeree, gli allergeni possono essere catturati da cellule dendritiche, che processano le molecole antigeniche e le presentano alle cellule T helper naive (TH0). La conseguente attivazione delle cellule TH2 specifiche per l'allergene è responsabile della produzione di interleuchina-4 (IL-4) e IL-13, che promuovono da parte delle cellule B la sintesi di anticorpi del tipo immunoglobuline E (IgE). Inoltre, le Th2 rilasciano IL-5, che induce la maturazione e la sopravvivenza degli eosinofili. Questi eventi sono facilitati da un difetto funzionale delle cellule T regolatorie (Treg) che producono IL-10 e transforming growth factor beta (TGF-beta). Oltre alle cellule Th2, possono essere attivate cellule Th9 che rilasciano IL-9, e ciò porta alla crescita e al reclutamento di mastociti, che – in seguito alla degranulazione

dipendente da IgE – rilasciano mediatori sia preformati sia sintetizzati de novo. Altri linfociti T importanti che contribuiscono alla patobiologia dell'asma sono le cellule Th17, le quali producono IL-17A e IL-17F, che a loro volta causano il reclutamento e l'espansione dei neutrofili. Inoltre, possono essere attivate le cellule Th1 dipendenti da IL-12 che rilasciano il gamma-Interferone (IFN-gamma), specialmente come risultato d'infezioni delle vie aeree sostenute da virus respiratori. Infine, anche molti mediatori, citochine e fattori di crescita prodotti da cellule diverse coinvolti nell'infiammazione asmatica cronica possono influenzare le funzioni ed il ritmo di proliferazione di cellule delle vie aeree del tipo strutturale, tra cui cellule epiteliali, fibroblasti, cellule muscolari lisce e cellule vascolari endoteliali.

Le cellule strutturali delle vie aeree inoltre producono mediatori dell'infiammazione e contribuiscono alla persistenza dell'infiammazione con modalità diverse. Attualmente, è stato riconosciuto il ruolo di circa 100 diversi mediatori che mediano la complessa risposta infiammatoria nelle vie aeree [24] nella fisiopatologia dell'asma.

I cambiamenti strutturali delle vie aeree

Nell'asma, oltre alla risposta infiammatoria, ci sono anche cambiamenti strutturali caratteristici delle vie aeree, descritti come “rimodellamento delle vie aeree”. Questi potrebbero essere interpretati come processi di riparazione in risposta ad uno stimolo infiammatorio cronico; alcuni di loro sono associati alla gravità della malattia e possono provocare il restringimento relativamente irreversibile delle vie aeree [25, 26].

La fibrosi sub epiteliale deriva dalla deposizione di fibre di collagene e di proteoglicani sotto la membrana basale. E' osservabile in tutti i pazienti asmatici, compresi i bambini, prima ancora dell'inizio dei sintomi e può essere influenzata dal trattamento. La fibrosi si verifica anche in altri strati della parete delle vie aeree con la deposizione di collagene e di proteoglicani. La muscolatura liscia delle vie aeree nell'asma tende ad aumentare attraverso un meccanismo d'ipertrofia (aumento delle dimensioni cellulari) e iperplasia (aumento delle divisioni cellulari). Questo processo, dovuto alla presenza di mediatori infiammatori come i fattori di crescita, comporta ispessimento delle pareti bronchiali [27] e può essere associato al livello di gravità della malattia. I vasi sanguigni nella parete delle vie aeree aumentano di

numero sotto l'influenza di fattori di crescita come il fattore di crescita endoteliale (VEGF): ciò contribuisce all'aumento dello spessore della parete bronchiale. L'ipersecrezione di muco è conseguente all'aumento del numero delle cellule caliciformi nell'epitelio delle vie aeree e del volume delle ghiandole sottomucose.

Iperreattività bronchiale

L'iperreattività bronchiale, la caratteristica funzionale più tipica dell'asma, comporta il fenomeno di ostruzione delle vie aeree in risposta a stimoli innocui per i soggetti normali. Questo restringimento, a sua volta, comporta la comparsa di limitazione del flusso aereo variabile nel tempo ed il verificarsi dei sintomi in maniera intermittente. L'iperreattività delle vie aeree è legata sia all'infiammazione sia al fenomeno di riparazione delle vie aeree, ed è parzialmente reversibile con la terapia. I suoi meccanismi non sono completamente noti.

FENOTIPO

Negli ultimi anni è aumentata la consapevolezza che le manifestazioni cliniche e la risposta al trattamento dell'asma sono eterogenee. Da qui il concetto di "fenotipo" [28, 29], la caratteristica di malattia che deriva dall'interazione del corredo genetico del paziente con l'ambiente. Sulla base di elementi clinici e di alcune caratteristiche dell'asma, sono stati definiti fenotipi diversi (ad esempio, l'asma indotto da aspirina, l'asma indotto dalla posizione prona) ed è tuttora in corso la ricerca degli aspetti patologici e molecolari in grado di spiegare pattern clinici differenti. Sono stati condotti, inoltre, molti studi sul fenotipo di tipo infiammatorio, che si fonda su una classificazione dei pazienti in base al risultato della conta cellulare eseguita sull'espettorato indotto: ad esempio, pazienti con fenotipo eosinofilo o non-eosinofilo mostrano una diversa risposta alla terapia con corticosteroidi inalatori [30, 31]; un aumento dei marcatori d'infiammazione può essere predittivo di riacutizzazione di malattia durante lo step down della terapia con steroidi [32]. I fenotipi infiammatori sembrano moderatamente stabili nel tempo, anche se i dati a disposizione ad oggi sono

limitati [33, 34]. Attualmente, l'identificazione del fenotipo infiammatorio può essere utile per i pazienti con asma grave oppure nel contesto della ricerca clinica.

Fenotipo infiammatorio Th2

Sebbene i dati sull'uomo siano ancora limitati, studi condotti su modelli animali e sull'uomo mostrano il coinvolgimento dei linfociti T helper di tipo 2 (Th2) in associazione a IL-4 e / o IL-13. I linfociti Th2 giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'asma, con incrementati livelli di IL-4 e/o IL-13 che contribuiscono al processo infiammatorio attraverso la differenziazione delle cellule epiteliali ciliate in un epitelio ricco di "goblet cells". Il rimodellamento dell'epitelio, associato a ipersecrezione mucosa, contribuisce alla morbilità e mortalità dell'asma.

Nonostante i dati non siano definitivi (a causa dei bassi livelli di citochine presenti nelle vie aeree dell'uomo), il pathway infiammatorio dell'IL-4 e IL-13, la 15-lipossigenase e l'ossido nitrico esalato (FeNO), sono tutti significativamente incrementati nelle cellule epiteliali bronchiali di soggetti con asma severo.

TRATTAMENTO DELL'ASMA

La terapia farmacologica dell'asma si distingue in due categorie: il trattamento "di fondo" e quello "al bisogno". I farmaci "di fondo", assunti quotidianamente e per un lungo periodo di tempo, servono per tenere l'asma sotto controllo attraverso il loro effetto antinfiammatorio. I farmaci sintomatici sono invece una terapia da utilizzare in caso di necessità, che agisce rapidamente, allevia la broncocostrizione e i sintomi che l'accompagnano.

Il trattamento dell'asma può essere somministrato con modalità differenti (per via inalatoria, orale, sistemica). Il vantaggio maggiore della terapia inalatoria è che il trattamento arriva direttamente nelle vie aeree, raggiungendo alte concentrazioni locali: ciò comporta una riduzione significativa della comparsa di effetti collaterali sistemici.

Corticosteroidi inalatori

I corticosteroidi inalatori sono i farmaci “di fondo”, al momento i farmaci antiinfiammatori più efficaci nel trattamento dell'asma persistente. Numerosi studi hanno dimostrato la loro efficacia nella riduzione dei sintomi dell'asma [35] e dell'iperreattività bronchiale [36], nel miglioramento della qualità di vita, della funzione respiratoria e del controllo dell'infiammazione delle vie aeree [37], nella riduzione della frequenza e della gravità delle riacutizzazioni [38] e della mortalità per asma [39]. Tuttavia, i corticosteroidi non curano l'asma e la sospensione della terapia comporta un peggioramento del controllo clinico, che si verifica in genere entro settimane-mesi in alcuni pazienti [40,41].

Antileucotrieni

Gli antileucotrieni comprendono gli antagonisti recettoriali dei leucotrieni cisteinici (CysLT1) (montelukast, pranlukast, zafirlukast) ed un inibitore della 5-lipossigenasi (zileuton). Studi clinici hanno segnalato che gli antileucotrieni hanno un effetto broncodilatatore piccolo e variabile, riducono i sintomi della malattia, compresa la tosse [42], migliorano la funzione polmonare e riducono l'infiammazione delle vie aeree ed il numero delle riacutizzazioni dell'asma [43-45]. Possono essere usati come un trattamento alternativo negli adulti con asma lieve persistente [46- 48] ed in alcuni pazienti con asma sensibile all'aspirina i quali, è stato documentato, rispondono bene alla terapia [49]. L'effetto degli antileucotrieni è inferiore a quello di basse dosi di corticosteroidi inalatori; nei pazienti che già li assumono, gli antileucotrieni non possono sostituire questo trattamento senza rischiare di perdere il controllo della malattia [50-51]. Gli antileucotrieni, come terapia aggiuntiva, riducono invece le dosi di corticosteroidi inalatori necessarie al paziente con asma moderato-severo [52] e possono migliorare il controllo dell'asma nei pazienti con asma non controllato da basse o alte dosi di corticosteroidi inalatori [53-55]. Ad eccezione di uno studio che ha dimostrato la loro equivalenza nel prevenire le riacutizzazioni [56], alcuni studi hanno dimostrato che gli antileucotrieni sono meno efficaci dei β 2-agonisti inalatori a lunga durata d'azione come terapia aggiuntiva dell'asma [57].

β2-agonisti orali a lunga durata d'azione

I β2-agonisti orali a lunga durata d'azione comprendono le formulazioni a lento rilascio di salbutamolo, terbutalina, e bambuterolo, un profarmaco convertito in terbutalina nel corpo. Sono utilizzati solo in occasioni rare, quando è necessaria una bronco dilatazione ulteriore. Il trattamento a lungo termine con corticosteroidi orali (per periodi superiori a 2 settimane) può essere necessario per il controllo dell'asma grave persistente, ma il loro uso è limitato dal rischio della comparsa di effetti avversi significativi.

β2-agonisti inalatori a lunga durata d'azione

I β2-agonisti inalatori a lunga durata d'azione non sono indicati come monoterapia poiché non modificano l'infiammazione delle vie aeree nell'asma, mentre sono più efficaci se associati ai corticosteroidi inalatori [58, 60]. Questa terapia di combinazione è da preferire quando una dose media di corticosteroidi inalatori, da sola, fallisce nel raggiungere il controllo della malattia: l'aggiunta di un β2-agonista di tipo inalatorio a lunga durata d'azione ad una terapia “di fondo” con corticosteroidi inalatori migliora i sintomi, diminuisce la frequenza dei risvegli notturni, migliora la funzionalità respiratoria, riduce sia l'uso di β2-agonisti inalatori a breve durata d'azione [61-63] sia il numero di riacutizzazioni [64-67], non aumenta il rischio di ricoveri ospedalieri dovuti all'asma e permette il controllo clinico della malattia nella maggior parte dei pazienti, più rapidamente e con un dosaggio inferiore di steroidi inalatori.

La terapia con β2-agonisti per via inalatoria a lunga durata d'azione causa effetti sistemici minori (stimolazione cardiovascolare, tremori muscolari e ipopotassiemia) rispetto alla terapia orale. L'uso regolare di β2-agonisti a rapida azione nella forma sia a breve sia a lunga durata può portare ad una refrattarietà relativa nei confronti dei β2-agonisti [68]. Nell'adulto non sono state evidenziate influenze del recettore β-adrenergico sull'efficacia o sulla sicurezza della terapia con beta2-adrenergici a lunga durata d'azione, quando somministrati in associazione con steroidi inalatori attraverso un unico *device*, in terapia di mantenimento, come sintomatico oppure con una dose regolare [69].

I broncodilatatori β 2-agonisti inalatori a rapida insorgenza d'azione sono i farmaci di scelta per la risoluzione in acuto della broncostruzione e per la profilassi della broncostruzione indotta da esercizio fisico, sia negli adulti sia nei bambini di tutte le età.

β 2-agonisti inalatori rapidi e β 2-agonisti orali a breve durata d'azione

I β 2-agonisti inalatori a rapida insorgenza d'azione sono i farmaci di scelta per la risoluzione del broncospasmo che si verifica durante le riacutizzazioni di asma e sono usati per la profilassi della broncostruzione indotta da esercizio fisico. Comprendono salbutamolo, terbutalina, fenoterolo, levalbutolo HFA209, reproterolo, e pirbuterolo. Il Formoterolo, broncodilatatore β 2-agonista a lunga durata d'azione, è indicato anche per la risoluzione dei sintomi, grazie alla sua rapidità di azione, ma con questo scopo dovrebbe essere usato con il minore dosaggio possibile solo nei pazienti che già assumono un trattamento regolare con corticosteroidi inalatori .

L'aumento dell'uso quotidiano di β 2-agonisti per via inalatoria a rapida insorgenza d'azione indica il deterioramento del controllo della malattia e la necessità di iniziare o aumentare il trattamento antinfiammatorio “di fondo”. Allo stesso modo, la mancanza di una risposta veloce ed efficace al trattamento con β 2-agonisti per via inalatoria nelle riacutizzazioni impone la necessità di porre attenzione da parte del medico e di valutare l'opportunità del ricorso a un breve ciclo di terapia con corticosteroidi orali.

RECETTORE β 2-ADRENERGICO

Struttura recettoriale

Il gene umano che codifica per il recettore β 2-adrenergico (β 2-AR) è situato sul braccio lungo del cromosoma 5 ed è costituito da 1.200 paia di basi [70]. Il recettore è una proteina di 46,5 KDa costituita da 413 residui amminoacidici, distribuiti in 7 domini transmembranari tra i quali se ne riconoscono 3 extracitoplasmatici, con la porzione ammino-terminale, e 3 intracitoplasmatici, con la porzione carbossi-terminale. Il recettore viene attivato mediante

N-glicosilazione sugli amminoacidi 6, 15 e 187; un processo importante non solo per l'inserimento all'interno della membrana cellulare, ma anche per il legame del recettore con l'agonista [71]. La presenza dell'amminoacido cisteina in posizione 341 è fondamentale per l'ancoraggio della catena carbossi-terminale alla membrana citoplasmatica [72].

Attivazione del recettore e trasduzione del segnale

L'attivazione del recettore β_2 -AR comporta l'incremento intracellulare dei livelli di cAMP [73]. Questo è il risultato della stimolazione dell'adenilato ciclasi, che catalizza la conversione dell'adenosintrifosfato (ATP) in cAMP. L'attivazione della proteina trimerica Gs si ottiene tramite il legame tra recettore β_2 e adenilato ciclasi (Figura 3).

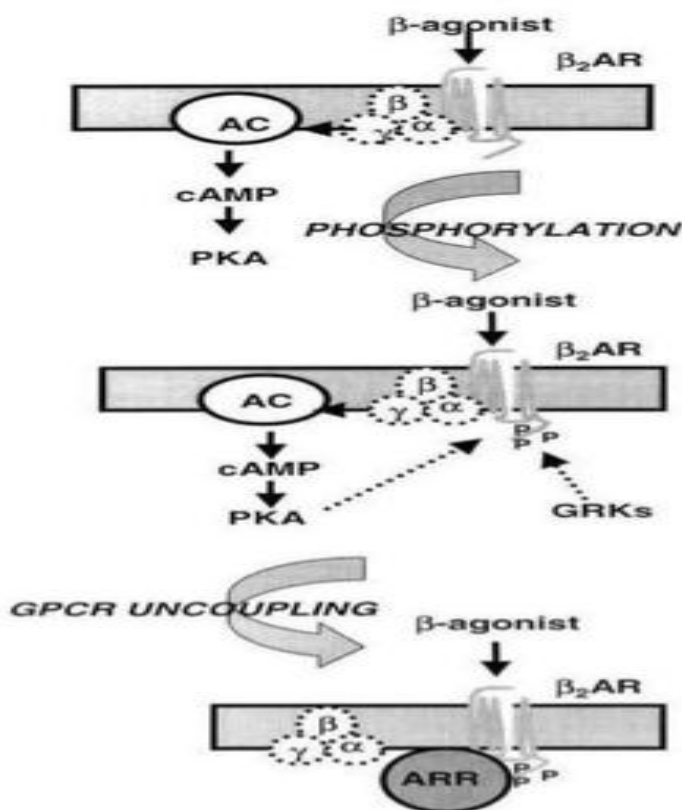


Figura 3. Attivazione recettore β_2 -AR

La proteina G è costituita da una subunità α (che stimola l'adenilato ciclasi) e da subunità $\beta\gamma$ (che trasducono il segnale). I livelli di cAMP sono regolati dalle fosfodiesterasi, che degradano il cAMP in 5'-AMP. Il meccanismo tramite il quale cAMP determina il rilassamento

della muscolatura liscia respiratoria non è del tutto chiaro, ma sembra che ciò si realizzi mediante l'attivazione della proteina chinasi A (PKA), la quale a sua volta fosforila proteine-chiave coinvolte nel processo di contrazione muscolare. Il cAMP, inoltre, risulta essere un inibitore del rilascio del calcio (Ca^{++}) dai depositi intracellulari, inibendone anche l'ingresso nella cellula e portando ad un rilassamento della muscolatura liscia.

E' stato evidenziato, inoltre, che i recettori β 2-adrenergici oscillano tra 2 forme, attiva e inattiva, e che, in condizioni di riposo, le due forme sono in equilibrio, con predominanza dello stato inattivato [74]. Il recettore β 2 è in forma attivata quando è associato con l' α -subunità della proteina Gs, insieme con una molecola di guanosina trifosfato (GTP). La sostituzione del GTP da parte di guanosina difosfato riduce drasticamente l'affinità della subunità α del recettore, provocando la sua dissociazione e inducendo il recettore a tornare nella sua forma inattivata.

Comunque, è stato visto recentemente che alcune risposte indotte dai β 2 agonisti sono mediate da meccanismi cAMP-indipendenti, i quali coinvolgono direttamente la proteina Gs ed i canali del potassio (K^+) presenti nelle cellule muscolari lisce dell'albero respiratorio [72]. I recettori β 2 possono essere accoppiati anche a proteine Gi [75].

Il risultato di questa associazione è la stimolazione di un segnale intracellulare che porta all'attivazione della p38MAPK, una proteina chinasi coinvolta nella trasmissione del segnale mitogenico. Per l'attivazione di questa via è necessaria la fosforilazione PKA-mediata del recettore β 2, l'assemblaggio di proteine intracellulari come Raf, Csrc, RAS con la subunità $\beta\gamma$ della proteina G, e l'attivazione di MAPK [75].

Da studi recenti è emerso, inoltre, che l'attivazione di questa via porta alla fosforilazione, da parte della MAPK, del recettore del glucocorticoide (GR) rendendolo più sensibile all'azione degli steroidi [76]. L'attivazione del recettore β 2-AR porta anche alla traslocazione del recettore GR dal citoplasma al nucleo, uno dei passaggi fondamentali nel meccanismo d'azione di questi farmaci [77, 78].

Desensibilizzazione recettoriale

Associato con l'attivazione del recettore β 2-adrenergico vi è il processo autoregolatorio di desensibilizzazione recettoriale. Questo processo avviene fisiologicamente per preservare il recettore da una sovra-stimolazione indotta da agonisti endogeni ed esogeni. La desensibilizzazione avviene in seguito al legame tra recettore e agonista ed i meccanismi attraverso i quali può avvenire sono di 3 tipi (Figura 4): (1) disaccoppiamento tra recettore e adenilato ciclasi; (2) internalizzazione del recettore non accoppiato; (3) down-regolazione.

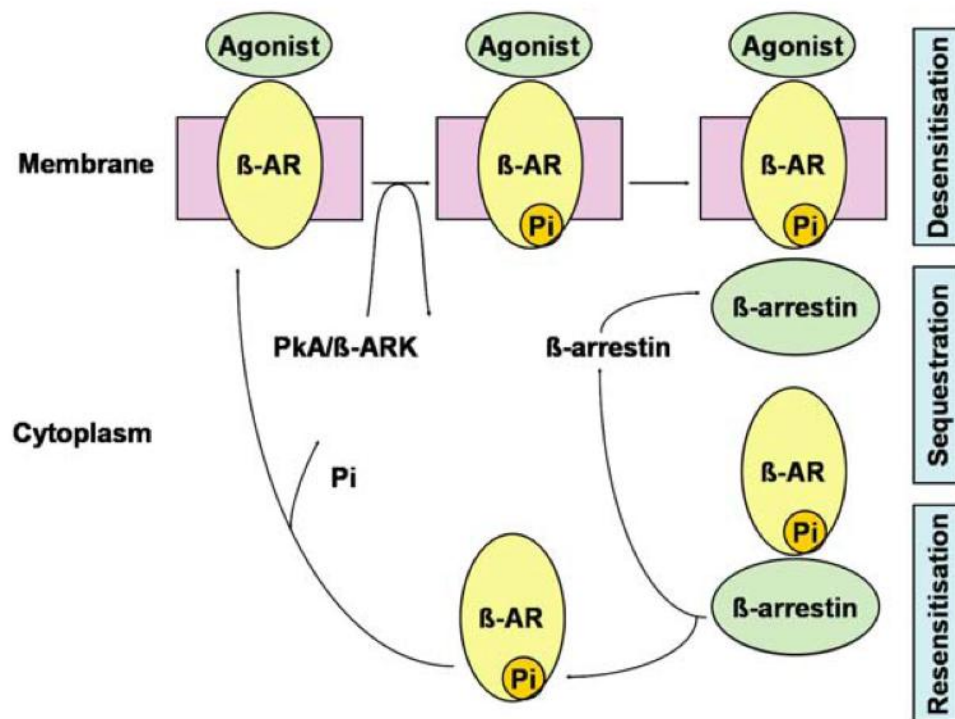


Figura 4. Desensibilizzazione del recettore β 2-AR

1. Il legame tra recettore e agonista innesca quasi immediatamente la fosforilazione di specifici residui amminoacidici di serina e treonina nel terzo loop intracitoplasmatico e nella terminazione carbossi-terminale del recettore. Il β 2-AR è fosforilato dalla PKA o da chinasi specifiche delle proteine G (GRK) [79, 80, 81]. Il legame dell'agonista con il recettore porta ad un'immediata traslocazione dei GRKs dal citoplasma alla

membrana ed alla successiva fosforilazione del recettore. Una volta ultimata la fosforilazione, la β -arrestina si lega al recettore, non permettendo più l'accoppiamento del recettore con la proteina Gs, limitando così la funzionalità recettoriale stessa. L'azione della β -arrestina si esplica anche mediante il legame con altre proteine, come la fosfodiesterasi IV [71]. L'attivazione di altri recettori, che utilizzano cAMP come secondo messaggero, può indurre desensibilizzazione eterologa del recettore β 2-AR, a causa della formazione di cAMP e della successiva attivazione di PKA. La desensibilizzazione omologa, invece, è la risultante dell'attivazione combinata di PKA e GRK.

2. L'arrestina non svolge solo un importante ruolo nel disaccoppiamento recettoriale, ma è anche un mediatore cruciale coinvolto nell'internalizzazione del recettore: infatti, vi è una forte connessione tra la fosforilazione del recettore β 2-AR ed il legame della β -arrestina con il processo di endocitosi di β 2-AR. Una delle funzioni della β -arrestina è quella di collegare il recettore β 2-AR con il sistema di endocitosi [82, 83, 84]. In seguito all'internalizzazione, il recettore β 2-AR può andare incontro a defosforilazione da parte degli enzimi endosomiali ed essere riciclato sulla membrana cellulare; oppure, può essere degradato dai lisosomi [85, 86]. L'internalizzazione e la degradazione lisosomiale del recettore β 2-AR comportano la necessità della neosintesi del recettore, affinché venga nuovamente espresso.
3. La down-regolazione del recettore β 2-AR è un processo che porta alla desensibilizzazione, come risultato di eventi trascrizionali. Lo studio condotto da Hadcock e Malbon (1988) [87] ha dimostrato che, in seguito all'esposizione all'agonista forskolina, alla concentrazione 10 μ M per 18 ore, si ha una riduzione del 50% dei livelli di espressione del recettore. Oltre alla capacità dei β -agonisti di indurre desensibilizzazione omologa, altri stimoli sono capaci di ridurre la risposta β -adrenergica, un processo definito desensibilizzazione eterologa. Ad esempio, gli agonisti muscarinici hanno la capacità di attivare la subunità inibitrice *G α* delle proteine G portando ad un'inibizione dell'adenilato ciclasi e attenuando la risposta del β -agonista attraverso l'attivazione di PKC [88]. Inoltre, uno studio recentemente

pubblicato ha dimostrato che la desensibilizzazione eterologa dei recettori $\beta 2$ -AR, risultante da un'esposizione prolungata alla PGE2 o alla forskolina, è mediata da un aumento dell'attività della PDE4. Numerose citochine, quali IL-1 β , TNF α , IL-5 e TGF β , riducono la capacità delle cellule muscolari bronchiali lisce di generare cAMP. Le citochine non alterano l'espressione della PKA e non hanno effetto sulla risposta cellulare alla forskolina, un agente che attiva direttamente l'adenilato ciclasi [89-92]. Questi risultati suggeriscono che il meccanismo di desensibilizzazione, in questo caso, si realizzi a livello dell'accoppiamento tra recettore β adrenergico e proteina Gs.

15-LIPOSSIGENASI 1

Nell'asma grave, ci sono abbastanza dati per sostenere una "Th2 signature" con infiammazione eosinofila [93, 94], produzione di muco [95-98], e up-regolazione del Th2 associato all'enzima 15-lipossigenasi 1 (15LO1) [99-100].

15LO1 è uno degli enzimi chiave del metabolismo dell'acido arachidonico, che metabolizza l'acido arachidonico per formare il composto stabile 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE). 15LO1 è espresso dalle cellule epiteliali delle vie aeree di soggetti asmatici, macrofagi, ed eosinofili. I macrofagi di soggetti asmatici mostrano maggiore espressione e attivazione di 15LO1 rispetto ai macrofagi di soggetti normali, e i livelli di 15-HETE aumentano con l'incrementare della severità dell'asma [101, 102]. L'espressione di 15LO1 in esperimenti in vitro è up-regolata nelle cellule epiteliali umane e nei macrofagi in risposta a IL-4 e IL-13. La conversione dell'acido arachidonico a 15-HETE [103, 107] inizia con il 15-HETE sintetizzato da monociti umani, poi esterificato con fosfatidiletanolamina (PE) per formare 15-HETE-PE [108]. Non è noto se le cellule epiteliali delle vie aeree umane generino 15-HETE libero o esterificato.

15LO1, e il suo prodotto 15HETE-PE, incrementano i livelli di MUC5AC in seguito a stimolazione con IL-13 in cellule epiteliali primarie umane delle vie aeree e attivano Extracellular Response Kinase (ERK) attraverso interazione fisica con PEBP1. Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) distacca PEBP1 da Raf incrementando l'attivazione di ERK.

L'attivazione di G-protein receptor kinase (GRK-2) compete anche con Raf-1 e 15-LO1 per il legame a PEBP1.

Cellule epiteliali umane delle vie aeree di soggetti con asma severo in esperimenti ex-vivo mostrano incrementata attivazione di ERK, il quale corrisponde a elevati livelli di espressione di 15-LO1 che si lega a PEBP1, il cui legame aumenta con l'incrementare della severità dell'asma.

La maggior parte del 15-HETE prodotto dall'attivazione del 15LO1 nelle cellule epiteliali delle vie aeree è esterificata a PE. Questo 15HETE-PE rimane intracellulare, suggerendo che sia coinvolto nei pathways di segnalazione cellulare: ciò è supportato dalla capacità di 15HETE-PE di attivare ERK e incrementarne l'espressione genica.

Sebbene i meccanismi con cui 15-HETE-PE attiva ERK non siano ancora conosciuti, pare che la porzione PE della molecola renda possibile l'interazione con PEBP.

PEBP1 e GRK-2

Raf kinase inhibitor protein (RKIP), un membro della famiglia delle phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) che si caratterizza per la capacità di legare fosfolipidi in vitro [109, 110], è una piccola proteina citosolica originariamente purificata dal cervello bovino. PEBP1 ha avuto ampia espressione in una varietà di specie di mammiferi quali scimmie, ratti e uomo.

La famiglia delle proteine PEBP è altamente conservata. L'mRNA di PEBP nell'uomo è lungo 1434 bp ed è trascritto da un gene formato da 4 esoni situato sul cromosoma 12q24.23 con un PEBP omologo sul cromosoma 2p.

Nell'uomo sono state identificate due PEBPs (1 e 4) che hanno affinità per la porzione PE del 15-HETE-PE.

Entrambe le PEBPs contribuiscono alla regolazione del pathway di segnalazione di ERK tramite interazione con Raf-1 [101, 112]. PEBP1 è l'unico inibitore naturale del pathway MEK-ERK.

L'inibitore della proteina chinasi Raf modula e controlla cruciali reti di segnalazione intracellulare, compresa la segnalazione di cascate di Raf / Mek / Erk, NFκB, glicogeno sintasi chinasi-3β (GSK3β) e G protein coupled receptors (GPCRs) [113- 117].

RKIP potrebbe legare Raf-1, MEK-1 e debolmente ERK-2 interferendo con la fosforilazione di MEK e l'attivazione di Raf-1. Tuttavia, RKIP non è un substrato di Raf-1 o MEK.

RKIP non si lega a Ras ne possiede attività chinasica. Raf-1 si dissocia dal suo complesso con MEK in presenza di RKIP. Di conseguenza a valle il segnale di mitogen activated protein kinase (MAPK) è interrotto e diminuito. Come affermato in precedenza, RKIP può legare RAF-1 o MEK, ma non contemporaneamente, comportandone a valle l'inibizione. Inoltre, è stato supposto che RKIP può essere coinvolto nello sviluppo, trasformazione e differenziazione, poiché è spesso deregolato in molte forme di tumore.

La struttura delle proteine RKIP / PEBP è caratterizzata da un β-sheet centrale circondato da più filamenti -β e α-eliche [118 - 120]. Questi elementi di struttura secondaria sono collegati da loop. La maggior parte dei membri di questa famiglia di proteine possiede una tasca di legame del ligando formata da residui amminioacidici altamente conservata. Questa tasca presenta un'elevata affinità per piccoli gruppi anionici, esempio fosfati, ed è implicata nel legame RKIP a Raf1 [121-124]. La capacità di RKIP di interferire con varie cascate di segnalazione e funzioni cellulari è dovuta alla presenza di questa tasca.

RKIP è stato suggerito come un importante modulatore della chinasi coinvolte nella trasduzione del segnale [125, 126]. Solo Raf1, MEK1 ed ERK2, che appartengono alla cascata chinasica mitogen activated protein (MAP), e G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK-2), una chinasi coinvolta nella desensibilizzazione delle G-protein coupled receptors (GPCR), sono stati identificati come partner d'interazione diretti di RKIP. Queste proteine sono chinasi ubiquitariamente espresse con un prominente ruolo nella regolazione di funzioni cellulari e, pertanto, devono essere strettamente regolate. La cascata di Raf / Mek / Erk è coinvolta in cancerogenesi e nello sviluppo dell'ipertrofia cardiaca [127, 128]. Questa cascata coordina l'espressione genica, la differenziazione, proliferazione e sopravvivenza cellulare. La sovraespressione di RKIP nelle cellule diminuisce trascrizione e trasformazione indotte da Raf1, mentre downregulation RKIP endogena ha effetti opposti. L'espressione ridotta di RKIP in alcuni tipi di Tumori ha dimostrato che può innescare metastasi e la progressione del

tumore: infatti, RKIP è discusso come marker prognostico nella prostata e del colon-retto cancro [129, 130] .

GRKs catalizzano la fosforilazione dei residui di serina e treonina citoplasmatici di attivazione del GPCR, e quindi, avviano il reclutamento della β -arrestine con successiva desensibilizzazione ed internalizzazione del recettore [131].

E' stato dimostrato che la via di segnalazione delle proteine G è facilitata da RKIP [130] .

GRK-2 è un inibitore a feedback negativo delle GPCR che fosforila e attiva le GPCR, disaccoppiando il complesso proteina G-GPCR, quindi provocando l'internalizzazione ed il riciclaggio delle GPCR ed inattivando la segnalazione delle proteine G .

L'importanza di GRK-2 nel controllo della segnalazione delle proteine G implica che l'attività di GRK -2 deve essere strettamente regolata. È stato dimostrato che RKIP è un inibitore fisiologico di GRK -2. In particolar modo, dopo stimolazione dei GPCR, RKIP si dissocia da Raf-1 e si lega a GRK -2, bloccandone l'attività. Questo switch viene innescato dalla proteina chinasi C (PKC) che fosforila RKIP sulla serina 153.

In sintesi, RKIP interferisce con diverse vie di segnalazione. E' stato dimostrato che PKC attivato può promuovere l'attivazione di diverse vie di segnalazione, sia attraverso l'induzione del rilascio di RKIP da Raf, sia promuovendo la segnalazione MEK / ERK ed inducendo associazione di RKIP a GRK -2, che promuove la via di segnalazione delle proteine G.

In condizioni omeostatiche PEBP1, piccola proteina globulare (23KDa), lega Raf-1 ed inibisce la segnalazione delle MAPK mediate da Raf-1 prevenendo la fosforilazione di Raf-1 sulla serina in posizione 338 e sulla tirosina 341. La fosforilazione di PEBP1, tramite PKC sulla serina 153, causa una modifica conformazionale nella tasca di legame del ligando e la dissociazione di Raf-1. [132-134]. La modifica conformazionale rilascia Raf-1 permettendo l'attivazione a valle del pathways MEK/ERK [135] (figura 5).

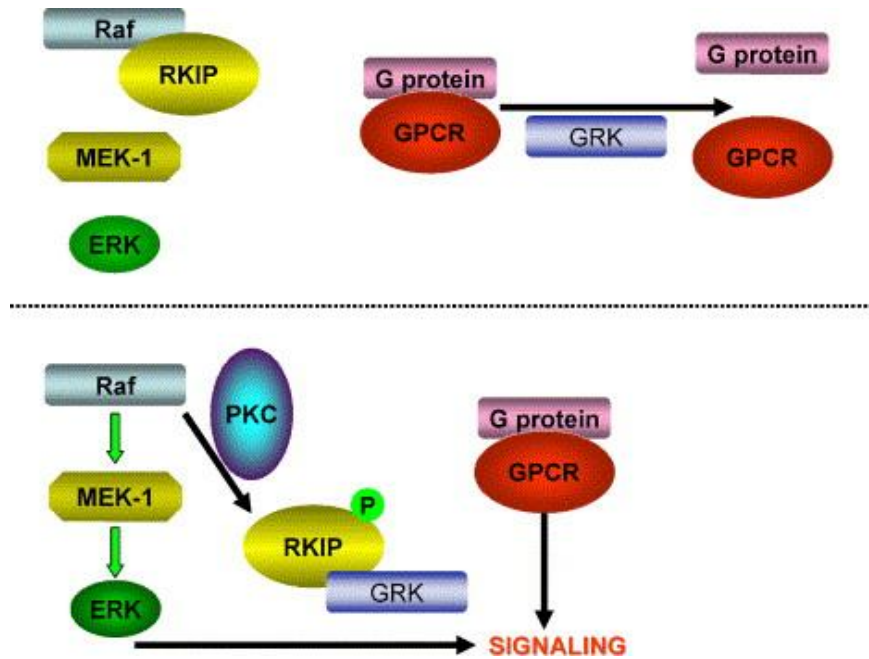


Figura 5. RKIP modula Raf e la segnalazione delle proteine G

Uno dei target di PEBP1 fosforilato è la G-protein coupled receptor kinase (GRK)-2 [136]. Questo enzima desensibilizza molte G-protein coupled receptor, incluso i recettori β 2-adrenergici (AR) d'importanza cruciale nella terapia dell'asma. PEBP1 dissociato da Raf-1 e, preferenzialmente, legato a GRK-2 promuove e sostiene l'attivazione del recettore β 2-adrenergico oltre che sostenere l'attivazione di ERK.

In altre parole, la fosforilazione di PEBP1 induce un cambio conformazionale che potrebbe alterare il pathways, prolungando l'attivazione di ERK e l'interazione con G-protein coupled receptor. Pertanto, in determinate condizioni, PEBP1/RKIP potrebbero contribuire all'amplificazione della risposta infiammatoria di tipo Th2.

PEBP1 è attivato nelle cellule epiteliali umane delle vie aeree in seguito ad esposizione a IL-13.

La fosforilazione di PEBP1, indotta da IL-13, porta alla dissociazione di PEBP1 da Raf-1 e all'attivazione del pathways di MEK/ERK. L'ipotesi è che 15LO1/HETE-PE modifichi l'attivazione di ERK attraverso interazione con PEBP1.

E' stato dimostrato, in esperimenti in vitro e in vivo su cellule epiteliali bronchiali di soggetti asmatici, che 15-LO1 compete con Raf-1 per legare PEBP1.

Inoltre, è stato dimostrato che nelle vie aeree, agenti β_2 adrenergici e adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cAMP) possono regolare importanti funzioni epiteliali, come trasporto ionico, secrezioni di macromolecole e frequenza del battito ciliare.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo dello studio è determinare se l'interazione di 15HETE-PE con PEBP1 è in grado di inibire il legame di PEBP1 a GRK-2, inducendo un incremento della desensibilizzazione del recettore β 2-adrenergico. Dunque, determinare i livelli di PEBP1 e GRK-2 in presenza di IL-13 e 15-HETE-PE esponendo o no ad Isoproterenolo (ISO).

Inoltre, ci proponiamo di valutare gli effetti dell'IL-13 e dell'isoproterenolo sulla fosforilazione del GRK-2 sulla Ser 670 e sulla fosforilazione sulle Ser355/Ser356 del recettore β 2 adrenergico.

Altro obiettivo dello studio è confermare l'implicazione biologica della mancanza d'inibizione di GRK-2 sulla desensibilizzazione del recettore β 2-adrenergico, valutando anche l'effetto dell'IL-13 sul rilascio di cAMP in risposta all'ISO.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Lo studio è stato condotto su tre gruppi di soggetti: soggetti normali (8), soggetti con asma lieve-moderato (16) e soggetti con asma severo (16). I soggetti di controllo non avevano alcuna storia di malattie polmonari e sono stati sottoposti ai test per verificarne la normale funzionalità polmonare. Tutti i soggetti con asma sono stati classificati secondo i criteri proposti dalla “American Thoracic Society” [137]. Gli asmatici lievi-moderati avevano assunto o erano in trattamento con basso dosaggio di corticosteroidi per via inalatoria. I soggetti con asma severo avevano assunto o erano in trattamento con corticosteroidi orali e agonisti β_2 long acting, venivano arruolati dal “National Heart Lung and Blood Institute’s Severe Asthma Research Program”) secondo i criteri dell’American Thoracic Society per il Refractory Asthma e sono stati trattati con alte dosi di corticosteroidi orali e / o per via inalatoria. Nessun dei soggetti selezionati aveva fumato nell’ultimo anno o aveva avuto una storia di fumo superiore a cinque/pacchi anno.

La broncoscopia con spazzolatura epiteliale endobronchiale è stata eseguita su 40 soggetti (soggetti sani di controllo, pazienti con lieve- moderata asma, pazienti con asma grave).

Caratteristiche demografiche

	Healthy Controls	Mild/Moderate Asthma	Severe Asthma
Gender (F/M)	5/3	11/5	12/4
FEV ₁ % predicted (median, range)	92.5 (79-123)	93 (64-110)	44 (31-80)
Race (C/AA/O)	6/1/1	13/2/1	12/2/2
BD response (yes/no)	0/8	3/13	10/6
OCS/ICS (yes/no)	0/8	6/10	16/0

C: Caucasian; AA: African American; O:Other: OCS: Oral corticosteroid; ICS:inhalator

Cellule epiteliali bronchiali in colture ALI (air-liquid-interface)

Gli effetti di IL-13 e dell'Isoproterenolo (ISO) sono stati studiati su cellule epiteliali bronchiali primarie umane cresciute in un sistema di coltura ALI (figura 6).

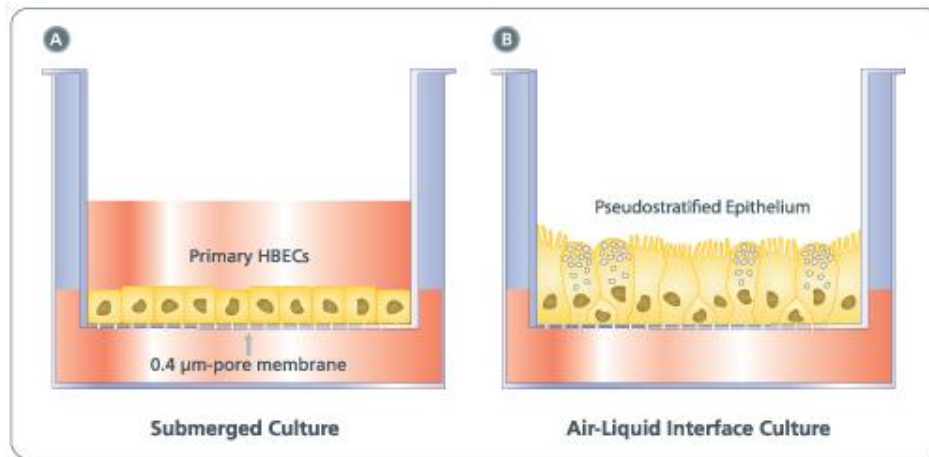


Figura 6. Schema del sistema di crescita cellulare nella fase sommersa (A) e seguita dalla fase air-lift (B). La coltura delle cellule all'interfaccia aria-liquido induce la differenziazione delle cellule epiteliali bronchiali di un epitelio mucociliare pseudo stratificato

L'epitelio delle vie respiratorie umane è un epitelio formato da cellule basali e colonnari indifferenziate, cellule ciliate e cellule con funzione secretoria. Esso è pseudistratificato nelle grandi vie aeree, ma diventa a prevalenza di cellule colonnari e cuboidali nelle piccole vie aeree. Le funzioni dell'epitelio sono: secernere muco; mantenere l'omeostasi di liquidi ed elettroliti; fornire una barriera contro agenti patogeni, gas tossici, xenobiotici, e particolati [138]. In individui sani, la riparazione epiteliale delle vie aeree è un processo continuo in risposta a senescenza cellulare e lesioni, caratterizzata da proliferazione cellulare e differenziazione per mantenere il normale strato epiteliale [139-141].

I modelli più comunemente utilizzati per studiare la biologia di vie respiratorie umane sono chiamati colture "air-liquid-interface" (ALI), dove l'epitelio delle vie aeree umane ottenuto mediante biopsia, spazzolatura, chirurgia, trapianto di polmone, o post-mortem, è messo in coltura su un substrato di collagene in presenza di fattori di crescita e acido retinoico, con la superficie apicale delle cellule esposto all'aria. In 2-3 settimane, le cellule si differenziano e formano un epitelio pseudostratificato che forma giunzioni strette, sviluppa le ciglia, e produce mucina. Colture di cellule ALI sono ampiamente utilizzate per studiare la biologia

dell'epitelio delle vie respiratorie, come modelli di danno e riparazione dell'epitelio delle vie respiratorie in condizioni sia fisiologiche sia patologiche.

In questo studio, le cellule epiteliali primarie ottenute da broncoscopia con spazzolatura epiteliale endobronchiale appena raccolte sono state poste direttamente in 15 ml di PBS freddo, centrifugate, lavate, e risospese in 1 ml di terreno di crescita per siero e ormonalmente integrato (BronchiaLife Basal Media, Lifeline cell technology) contenente 50 mg / ml gentamicina e 50 mg / ml amfotericina. Dopo il conteggio delle cellule, un totale di $4-5 \times 10^5$ cellule sono state seminate in piastre di 60 - mm precedentemente coattati con collagene.

Le cellule sono state coltivate a 37°C in un ambiente di CO₂ al 5%. Quando le cellule epiteliali avevano raggiunto il 70%-80% di confluenza, sono state staccate con tripsina e 4×10^4 sono state trasferite su Transwell in poliestere da 12 mm di diametro (dimensione dei pori, 0,4 mm) coattate con collagene. Quando le cellule hanno raggiunto il 50-60% di confluenza, il terreno di coltura è stato sostituito e deprivato dell'epinefrina, poiché questa potrebbe interferire con la funzionalità del recettore adrenergico. Al raggiungimento del 100% di confluenza, le cellule epiteliali primarie crescono in condizioni ALI con soli 50 µl di terreno di coltura nella zona apicale.

Questo è indicato come giorno 0 delle colture ALI. Al giorno 2 le cellule sono state stimulate per 48 ore con IL -13 (10 ng/ml) e Isoproterenolo (Isoproterenol hydrochloride, Sigma-Aldrich) (1µM) per 10 minuti. Infine, si è proceduto alla lisi delle cellule e l'estratto proteico è stato sottoposto ad analisi mediante western blot per il recettore β₂-adrenergico nella sua fosforilata (p-β₂-AR) e non (tot-AR), e per GRK-2 fosforilato (p-GRK2) e non (tot-GRK-2). Per il silenziamento genico, le cellule sono state stimulate 48 ore con IL -13 (10 ng/ml) e ISO (1µM) per 10 minuti e con ISO (1µM) 30 minuti, poi le cellule sono state lavate con PBS1x sterile e di nuovo stimulate per 10 minuti con ISO. Al termine del trattamento si è proceduto alla raccolta ed i campioni sono stati sottoposti a saggi Western-blot e Co-Immunoprecipitazione.

Western Blot

La valutazione dell'espressione di p- β 2-AR, tot-AR, p-GRK2, tot-GRK-2, è stata effettuata tramite western blot su 2 soggetti sani di controllo, su 4 soggetti con asma moderato e 5 soggetti con asma severo. Sono stati utilizzati gel di poliacrilammide al 4-12% (NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1,5 mm, 10 well) e sono state caricate 40 μ g di proteine totali. Alla corsa elettroforetica è seguito il trasferimento su membrana, il blocking (5% BSA in PBS-T) e l'incubazione con gli specifici anticorpi primari: anticorpo policlonale di rabbit anti-pGRK-2 (1:500) (Invitrogen), anticorpo policlonale di rabbit anti-GRK-2 (1:250) (Cell Signaling Technology Inc), anticorpo policlonale di rabbit anti-p- β 2-AR (ser 355\ser 356) (1:200) (Santacruz), anticorpo policlonale di rabbit anti- β 2-AR (1:250) (Sigma Aldrich), anticorpo policlonale di goat anti-GAPDH (1:1000) (Sigma Aldrich), anticorpo policlonale anti-15-LO1 (1:100) (anticorpo preparato da Doug Conrad, University of California, San Diego). Al termine, le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-rabbit HRP (1:5000) (Sigma Aldrich), o anti-goat HRP (1:5000) (Novus Biologicals). La rivelazione è stata effettuata tramite sistema in chemiluminescenza con enzima per la perossidasi (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate - Thermo scinetific). Le membrane sono state sviluppate e le densitometrie effettuate tramite l'utilizzo del Multi Gauge Software (Fuji Digital Co.). I dati sono stati espressi come rapporto dell'intensità della banda della proteina fosforilata o totale verso la corrispondente GAPDH, utilizzata come proteina housekeeping.

Co-Immunoprecipitazione

Per valutare se PEBP1 è legata a Raf-1 prima della stimolazione con IL-13 e per valutarne gli eventuali legami a GRK-2 dopo stimolazione con IL-13 abbiamo effettuato la co-immunoprecipitazione.

Dopo aver proceduto con la stimolazione con le modalità precedente indicate, le cellule sono state lavate con PBS a freddo prima di procedere con la lisi con un blando lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40) con aggiunta d'inibitori delle proteasi. Le cellule lisate, dopo una fase di preclearing con Proteina A/G-Agarosio (Protein A/G Plus- Agarose- SantaCruz), sono state incubate in oscillazione con l'anticorpo

primario rabbit anti-PEBP1 (FL-187) (SantaCruz) overnight. Successivamente, è stata aggiunta la Proteina A/G-Agarosio per 3 ore a 4C°. Gli immunoprecipitati sono stati poi lavati e bolliti con 2x SDS sample buffer per 2 minuti. Dopo centrifugazione, il surnatante proteico è stato separato su 12 % gel di poliacrilammide per western blot usando l'anticorpo primario anticorpo policlonale di rabbit anti-GRK-2 (1:250) (Cell Signaling Technology Inc). IgG non immunizzate sono state utilizzate per confermare la specificità del legame. Le membrane sono state sviluppate e le densitometrie effettuate tramite l'utilizzo del Multi Gauge Software (Fuji Digital Co).

Silenziamento genico siRNA

Le cellule epiteliali primarie coltivate in sistema ALI sono state trasfettate con siRNA ALOX 15 e stimulate con IL-13 per 48 ore e con ISO per 10 minuti e per 30 minuti più ulteriori 10 minuti. Per questi esperimenti sono state utilizzate le cellule recuperate da 2 soggetti sani di controllo, 3 soggetti con asma moderato e 4 soggetti con asma severo. In seguito, è stata determinata la quantità della proteina 15LO1 mediante western blot per verificarne il coinvolgimento nel rilascio di cAMP. Allo stesso modo, le cellule sono state trasfettate con sequenze Scrambled che sono state usate come controllo negativo.

La trasfezione con il metodo siRNA è stata effettuata quando le cellule avevano una confluenza del 70-80% in piastre Transwell a 12 pozzetti tramite immersione delle colture cellulari nel reagente di trasfezione Mirus si-Quest (TransIT-siQUEST transfection reagent-Mirus). I reagenti Mirus si-QUEST (2 µl/pozzetto) sono stati diluiti separatamente in Terreno di coltura OPT-MEM (Life technology).

Dopo incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti, il reagente Mirus si-QUEST e i siRNA per ALOX-15 e siRNA Scramble (alla concentrazione finale di 50 nM) sono stati messi insieme alla miscela di trasfezione ed incubati per ulteriori 30 minuti.

A questo punto, il terreno di coltura presente nella parte superiore delle Transwell è stato rimosso, sono stati aggiunti 300 µl di miscela di trasfezione in ciascun pozzetto e si è incubato per 24 ore.

Dopo l'incubazione, la miscela di trasfezione è stata trasferita nella parte bassa della camera di ciascun pozzetto e sono stati aggiunti 50 μ l di terreno nella parte apicale. Questo corrisponde al giorno 0. Poi, si è proceduto ad incubare con IL-13 per 48 ore. Allo scadere delle 48 ore le cellule sono state incubate con l'ISO per 10 minuti, e con ISO 30 + 10 minuti.

cAMP assay

Per valutare il rilascio di cAMP in seguito a stimolazione delle cellule con modalità e tempi d'incubazione precedentemente descritti, è stato utilizzato il Cyclic AMP XP Assay kit (Cell Signaling) in cellule epiteliali bronchiali recuperate da 6 soggetti con asma severo. Il Cyclic AMP Assay kit è un saggio immunoenzimatico competitivo atto a determinare i livelli di cAMP in cellule o tessuti d'interesse. In questo saggio, il cAMP trovato nel campione compete con una quantità determinata di HRP-linked cAMP per il legame all'anticorpo anti-cAMP XP rabbit immobilizzato su una piastra a 96 pozzetti. L'eccesso di cAMP del campione e del complesso cAMP legato all'enzima che non ha reagito vengono allontanati previo lavaggio con una soluzione tampone. In seguito all'aggiunta di un cromogeno (TMB), è possibile determinare la presenza del coniugato (cAMP – enzima) legato poiché viene utilizzato come substrato dell'enzima per reazione colorimetrica che comporta la comparsa di una tinta blu nei pozzetti. L'intensità della colorazione sviluppata è inversamente proporzionale alla quantità di cAMP del campione. In altre parole, la sua assenza risulta da una tonalità blu vivace mentre la sua presenza è indicata da una diminuzione del colore che tende al bianco.

La lettura colorimetrica prevede l'utilizzo di uno spettrofotometro che generalmente indica il valore dell'assorbanza a una determinata lunghezza d'onda in funzione della concentrazione.

Analisi statistica dei risultati

L'analisi statistica è stata effettuata tramite JMP SAS software. I dati sono stati espressi come mediana e intervallo di variazione percentile (compreso tra il 25 a 75%).

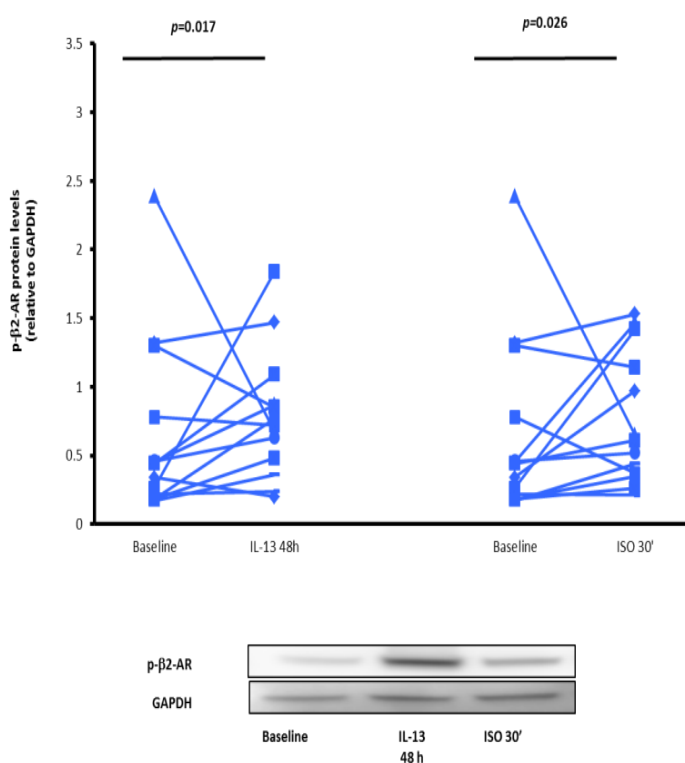
L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il metodo statistico *t-test* e la comparazione tra le diverse condizioni sperimentali è stata valutata mediante analisi della varianza (ANOVA) seguita da correzione Fisher per comparazioni multiple. I valori di $p \leq 0.05$ sono stati accettati come statisticamente significativi.

Risultati

Sintesi di p- β 2-AR in seguito a stimolazione con IL-13

L'analisi del lisato proteico totale tramite western blot dimostra un incremento statisticamente significativo dei livelli di p- β 2-AR in cellule epiteliali bronchiali primarie pre-incubate con IL-13 (10 ng/ml) per 48 ore e successivamente stimulate con ISO per 30 minuti, in paragone a cellule non trattate. La fosforilazione del recettore risulta essere significativamente incrementata sia normalizzando i nostri valori con GAPDH (figura 7a) sia valutando i risultati in relazione alla quantità totale di recettore β 2-adrenergico (figura 7 b). Questi risultati lasciano ipotizzare che l'IL-13, inducendo la fosforilazione del recettore β 2 adrenergico, causi maggiore desensibilizzazione e internalizzazione del recettore.

a)



b)

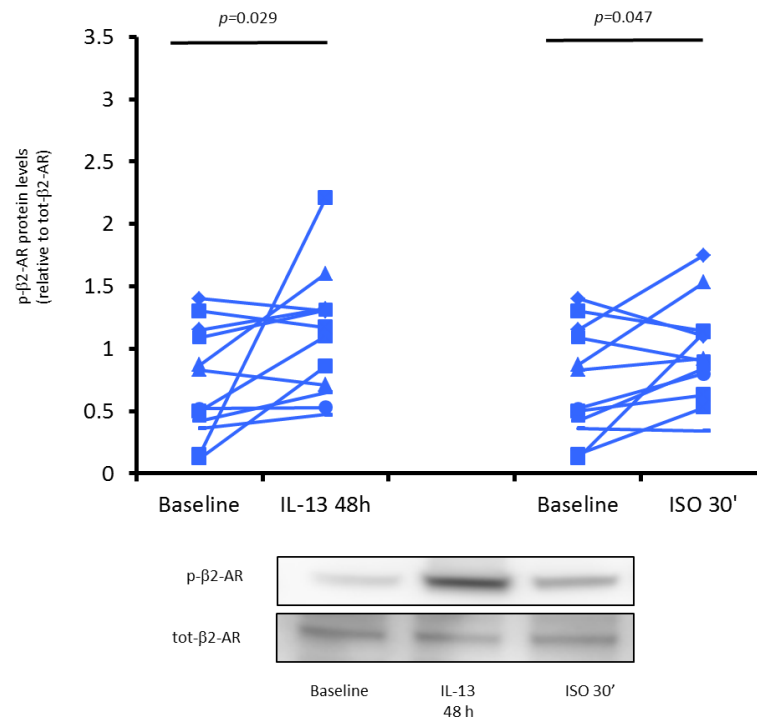


Figura 7. IL-13 e ISO incrementano la fosforilazione di p-β2-AR sia normalizzando i valori con GAPDH (a) che con tot-β2-AR (b.)

Il trattamento delle cellule epiteliali bronchiali con IL-13 incrementa la sintesi di 15LO1, la fosforilazione di PEBP1 e l'attivazione del pathway di ERK.

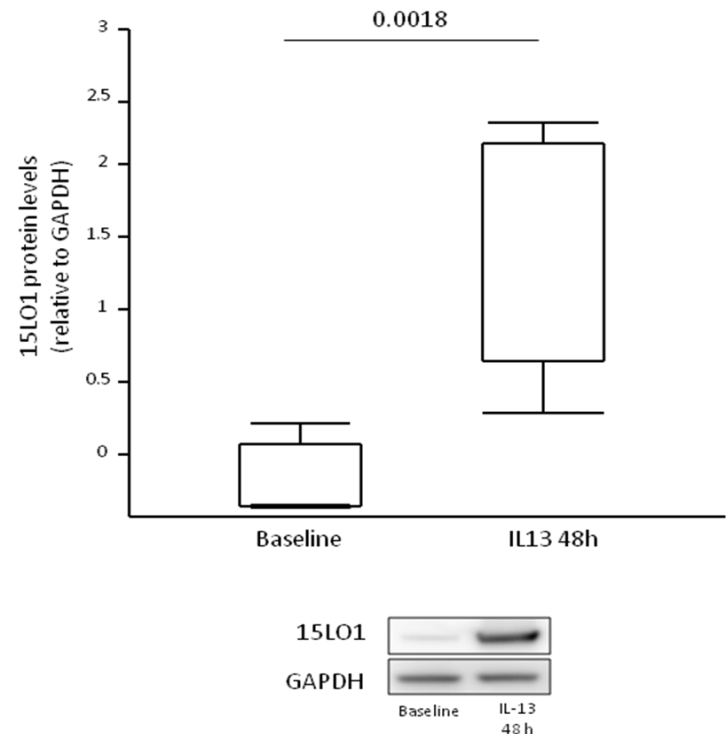
Negli estratti proteici di cellule epiteliali bronchiali primarie, cresciute in sistema di coltura ALI, sono stati valutati mediante western blot i livelli proteici di 15LO1, pPEBP1 e pERK.

Abbiamo osservato che i livelli proteici di 15LO1 incrementano in modo statisticamente significativo in seguito a stimolazione con IL-13 (48 ore), rispetto ai valori di base (*figura 8 a*). Allo stesso modo, si osserva un incremento statisticamente significativo di PEBP1 fosforilato (*figura 8 b*).

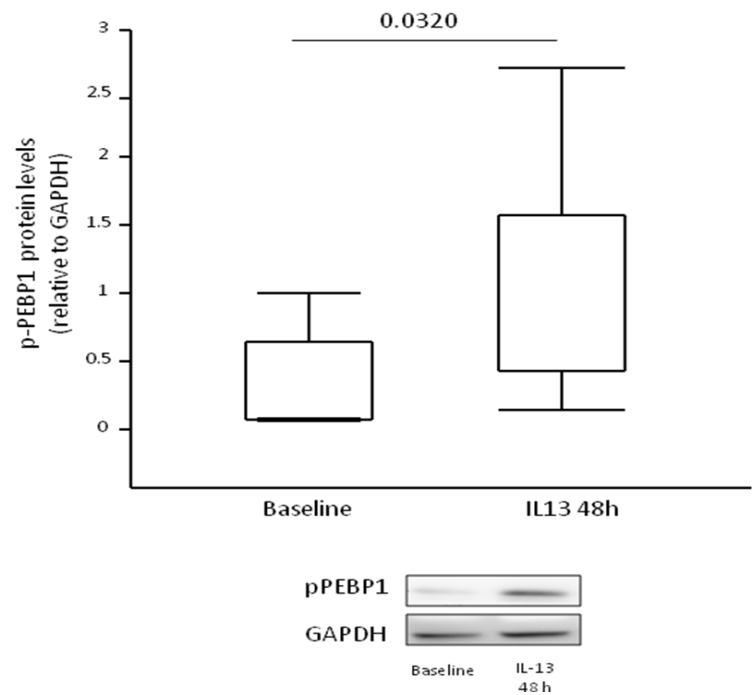
Inoltre, è stato evidenziato che l'incremento di legame a PEBP1 è accompagnato da un incremento statisticamente significativo dell'attivazione di pERK in cellule epiteliali bronchiali (*figura 8 c*).

Riassumendo, si assiste così ad un incremento dei livelli proteici di 15LO1, p-PEBP1 e p-ERK in seguito a stimolazione con IL-13 per 48 ore.

a)



b)



c)

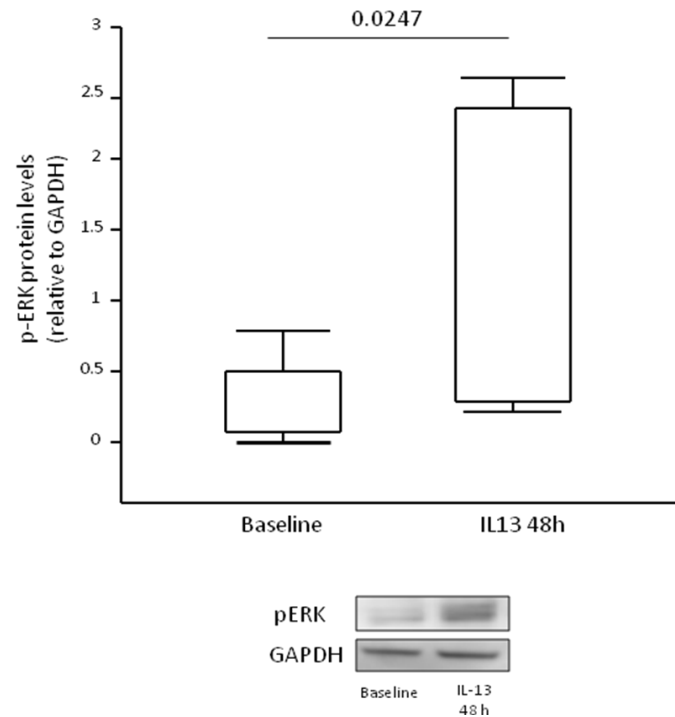


Figura 8. IL-13 induce incrementati livelli proteici di 15LO1 (a), di p-PEBP1 (b) e p-ERK (c) in cellule epiteliali bronchiali primarie umane.

Inoltre, esperimenti di co-immunoprecipitazione, in cui abbiamo immunoprecipitato l'estratto proteico con anticorpo anti-PEBP1 e rivelato mediante western blot con anticorpi primari anti-GRK2 e anti-15LO1, hanno messo in evidenza un incremento del legame sia di GRK2 sia di 15LO1, in conseguenza a stimolazione con IL-13 per 48 ore, alla proteina PEBP1. Questi esperimenti suggeriscono che il legame 15 HETE-PE/15 LO1 a PEBP1 efficacemente compete con il legame a GRK-2 in cellule epiteliali bronchiali stimulate con IL-13 (*figura 9*). Ciò potrebbe portare ad una maggiore fosforilazione/internalizzazione del β 2-AR rispetto alla condizione base non stimolata con l'IL-13.

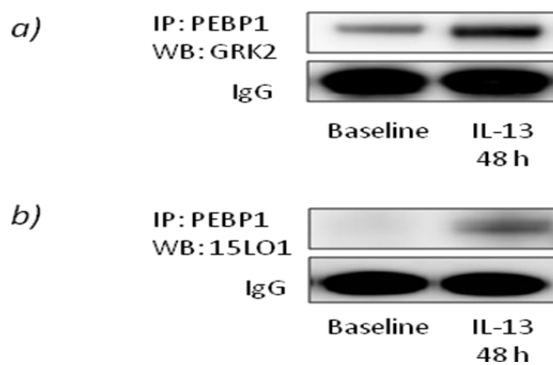


Figura 9. IL-13 incrementa il legame di GRK-2 (a) e 15LO1 (b) a PEBP1

Questo risultato, insieme al dato che la fosforilazione di PEBP1 porta alla dissociazione di PEBP1 da Raf-1 ed all'attivazione del pathways di MEK/ERK, lascia ipotizzare che la stimolazione con IL-13 delle cellule epiteliali bronchiali sia responsabile di un incremento dell'enzima 15LO1 che maggiormente si lega a PEBP1 distaccandolo da Raf-1 e di un incremento del legame di GRK-2 allo stesso sito di legame su PEBP1.

Desensibilizzazione del recettore β 2 in cellule epiteliali bronchiali primarie: implicazione biologica della mancata inibizione di GRK-2.

Mediante western blot, abbiamo valutato gli effetti di IL-13 e ISO rispettivamente dopo 48 ore e 30 minuti di stimolazione in cellule epiteliali bronchiali primarie sulla forma fosforilata della proteina GRK-2. Abbiamo visto che queste due molecole sono in grado di incrementare la quota di p-GRK-2 in modo statisticamente significativo rispetto alle cellule di base (*figura 10*).

Dunque, IL-13 e ISO, attraverso l'iniziale fosforilazione di GRK2, possono indurre la fosforilazione del recettore β 2-adrenergico causando la desensibilizzazione e internalizzazione del recettore.

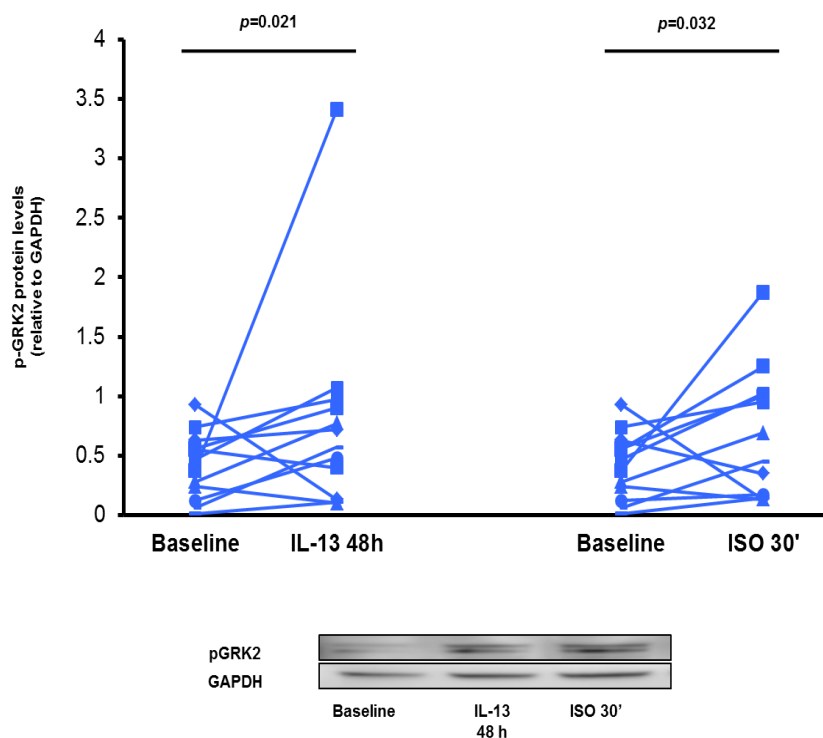


Figura 10. Grafici che evidenziano l'incremento della fosforilazione di GRK-2.

L'attivazione del recettore adrenergico $\beta 2$ incrementa i livelli intracellulari di cAMP.

In questa fase dello studio, abbiamo dimostrato, confermandolo, un dato ormai noto: il trattamento delle cellule epiteliali bronchiali umane con un $\beta 2$ agonista a breve durata d'azione, quale l'ISO, comporta incremento statisticamente significativo dei livelli di cAMP intracellulare, dopo appena 10 minuti di stimolazione rispetto ai valori di base. Inoltre, abbiamo messo in risalto che il pretrattamento delle cellule epiteliali bronchiali per 30 minuti con il farmaco riduce in modo statisticamente significativo di circa il 20% il rilascio di cAMP rispetto alla stimolazione con ISO per soli 10 minuti.

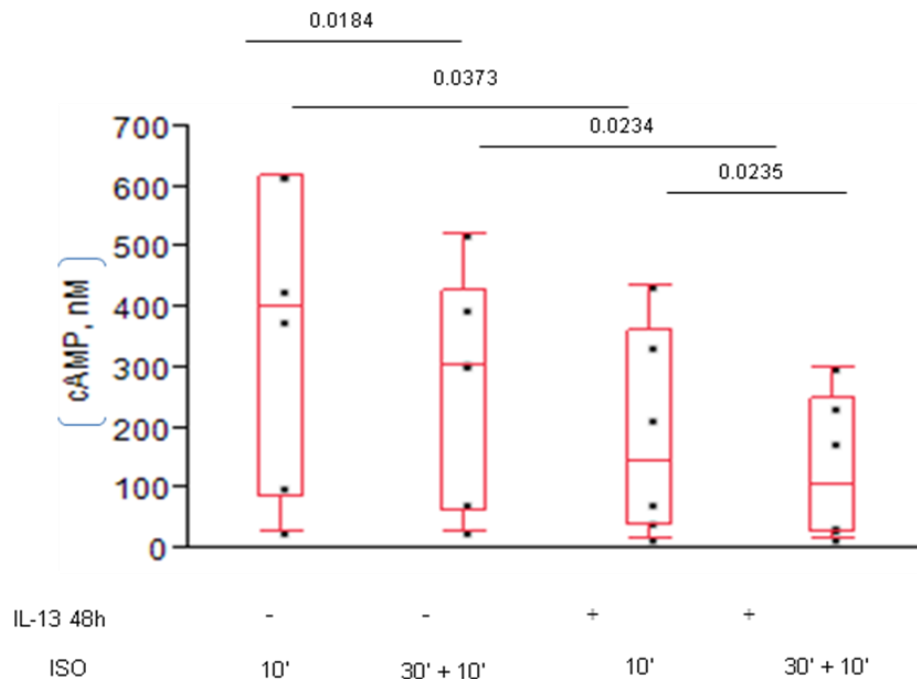


Figura 11. IL-13 inibisce il rilascio di cAMP in risposta a ISO

Inoltre, abbiamo dimostrato un dato assolutamente nuovo: il pretrattamento delle cellule epiteliali bronchiali con IL-13 per 48 ore provoca una riduzione statisticamente significativa di circa il 50% nei livelli di cAMP sia nella condizione in cui il farmaco è stato aggiunto per soli 10 minuti sia nella condizione in cui le cellule sono state trattate con ISO per 30 minuti più ulteriori 10 minuti (figura 11).

Questi risultati suggeriscono che l'esposizione delle cellule a un farmaco β_2 agonista potrebbe causare una rapida attivazione delle proteine Gs e dell'adenilato ciclasi, con conseguente incremento nei livelli di cAMP. Ciò sottolinea che elevati livelli di IL-13 inibiscono il rilascio di cAMP intracellulare altrimenti indotto dall'ISO, portando ad una rapida desensibilizzazione del recettore β_2 adrenergico con conseguenti effetti sui meccanismi di broncodilatazione e di risoluzione dell'infiammazione.

Effetto dell'enzima 15LO1 nel rilascio di cAMP

Il silenziamento dell'espressione di 15LO1 mediante siRNA ALOX 15 in cellule epiteliali bronchiali stimulate con IL-13 (10ng/ml) per 48 ore e con ISO (1 μ M) sia per 10 minuti sia per 30 più ulteriori 10 minuti (*figura 12*) porta ad un decremento della sintesi della proteina 15LO1 che corrisponde ad un incremento del rilascio di cAMP rispetto al controllo negativo rappresentato dalla condizione scramble.

Tali risultati suggeriscono il coinvolgimento della 15LO1 nella regolazione dei meccanismi di desensibilizzazione e di risposta ai farmaci β 2 agonisti.

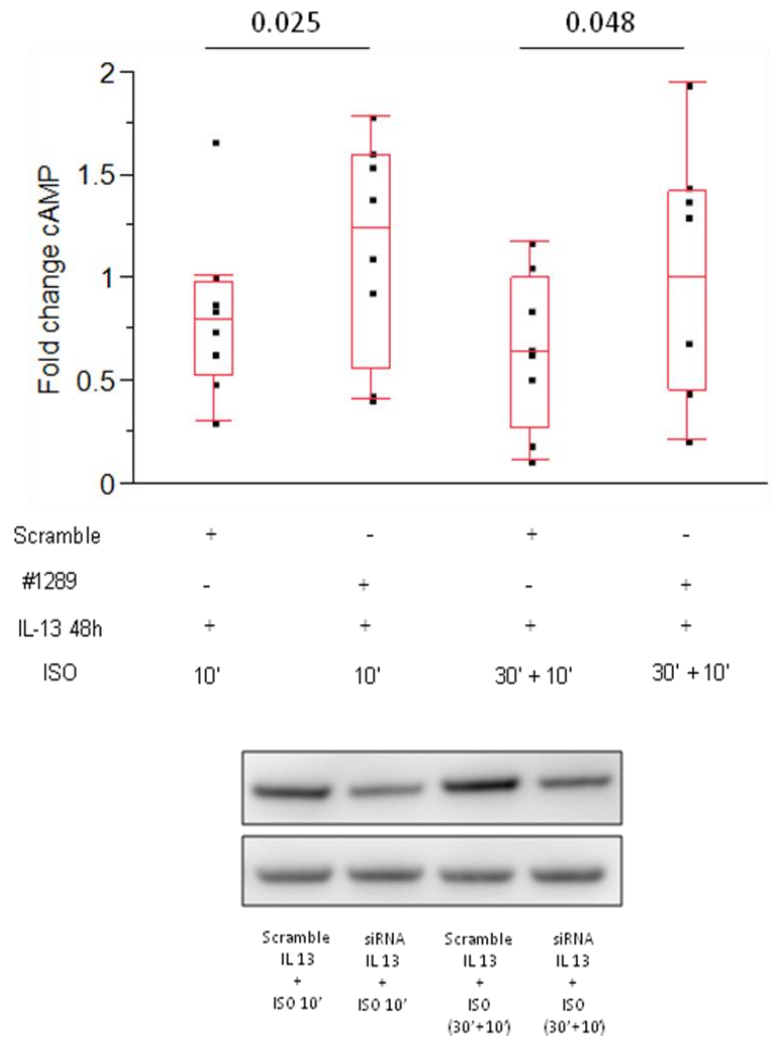


Figura 12. Il Silenziamento di 15LO1 dimostra un incremento nei livelli di cAMP intracellulare, dopo pretrattamento delle cellule con IL-13 se confrontate con le condizioni sperimentali trattate solamente con ISO

Discussione

Questo studio ha messo in evidenza tre elementi importanti: il ruolo chiave dell'IL-13 e dell'ISO, il coinvolgimento dell'enzima 15LO1 e l'importanza di PEBP come modulatore della chinasi, G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK-2), nei meccanismi di desensibilizzazione del recettore β_2 adrenergico e, di conseguenza, sui meccanismi di broncodilatazione e risoluzione dell'infiammazione.

I β_2 agonisti, oltre ai corticosteroidi (CS), sono farmaci usati nel trattamento dell'asma e i pathway che contribuiscono alla regolazione della loro attività sono d'importanza critica. Inoltre, l'uso di β_2 agonisti a lunga durata d'azione (LABA), un altro pilastro per il trattamento dell'asma, è stato associato a downregolazione del recettore che, almeno in assenza di CS inalato, comporta un piccolo ma reale rischio di aumento della mortalità e della morbidità da LABA [142]. I pazienti con asma severo mostrano una mancata risposta ai farmaci β_2 agonisti, che nel trattamento farmacologico dell'asma vengono utilizzati prevalentemente per il controllo dell'ostruzione delle vie aeree.

I meccanismi coinvolti nella downregolazione del recettore sono complessi: due dei più studiati coinvolgono la fosforilazione del β_2 -AR mediante un processo mediato da PKA o GRK-2. La fosforilazione del β_2 -AR porta al legame della β -arrestina, internalizzazione e riciclaggio del recettore [143]. Pertanto, i meccanismi che aumentano la desensibilizzazione del recettore β_2 possono essere di rilevanza per la terapia dell'asma.

I risultati riportati identificano un ruolo critico dell'IL-13 e di 15LO1 nei meccanismi di desensibilizzazione del recettore β_2 adrenergico. L'attivazione/espressione di 15LO1 è associata ad una maggiore attivazione di ERK nelle vie respiratorie umane. In risposta a stimolazione con IL-13, l'iniziale attivazione di IL4R α comporta fosforilazione di PEBP1, con rilascio di Raf-1 ed attivazione di ERK in assenza di 15LO1. Tuttavia, dopo stimolazione indotta da IL-13, 15LO1/15HETE-PE competitivamente dissocia Raf-1 da PEBP1 per sostenere e aumentare l'attivazione di ERK, indipendentemente dalla fosforilazione di PEBP1, e migliorare l'espressione genica a valle.

Questo studio conferma un'interazione unica di 15LO1/15HETE-PE con PEBP1 e, soprattutto, con GRK-2. Inoltre, mette in evidenza il coinvolgimento di 15LO1 nel rilascio di cAMP intracellulare con effetti sui meccanismi di broncodilatazione e di risoluzione dell'infiammazione.

15LO1 è un enzima chiave, appartenente alla classe degli eicosanoidi, coinvolto nel metabolismo degli acidi grassi. Sia 15LO1 sia uno dei suoi prodotti, 15HETE, sono aumentati nell'asma in relazione a infiammazione eosinofilica. Inoltre, 15LO1 è uno dei geni maggiormente indotti da IL-13.

Un ruolo importante di 15LO1 nei processi infiammatori di soggetti asmatici è ulteriormente suggerito dalla recente conferma del suo ruolo fondamentale nell'espressione di MUC5AC nell'uomo (146). 15HETE esogeno indotto da IL-13 incrementa l'espressione di MUC5AC in cellule epiteliali delle vie aeree umane e stimola la produzione di muco in esperimenti condotti sulla trachea di ratto. Tuttavia, il meccanismo con cui 15LO1 regola l'espressione MUC5AC rimane sconosciuto. In contrasto con il ruolo pro-infiammatorio di 15LO1 nell'asma di modelli murini, ci sono dati provenienti da modelli su coniglio in cui l'over-espressione di 15LO1 suggerisce un ruolo anti-infiammatorio della stessa durante aterosclerosi (37, 38). Se questa differenza è a causa della malattia o del modello animale resta da chiarire.

A differenza di altri eicosanoidi, 15LO1 non sembra funzionare attraverso meccanismi recettoriali, e, in effetti, non è stato identificato alcun recettore. Uno studio sull'interazione dei lipidi in cellule dendritiche mostra che 15LO1 si lega ai fosfolipidi (phosphatidylinositol (PIs) e certamente ethanolamine glycerophospholipids (PEs) e ne stimola la generazione di 15HETEs e di 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13HODEs). Studi precedenti hanno mostrato che, dopo aggiunta acuta, 15HETE esogeno è stato incorporato in PI intracellulare nei neutrofili (39) e nelle cellule epiteliali. Poiché solo 10% del 15HETE-PI era rilevabile dopo 48 ore, il suo ruolo nei lunghi periodi di tempo non è chiaro.

Al contrario, studi effettuati sui monociti hanno dimostrato che 15HETEs endogeno è generato coniugato con PE intracellulare, e, in cellule epiteliali bronchiali primarie IL-13 induce la coniugazione di 15HETE a PE intracellulare. Queste differenze nella coniugazione di 15HETE sostengono la presenza di diversi processi biologici dipendenti dal tipo di cellula, dall'aggiunta esogena o dalla generazione endogena di 15HETE e dei suoi coniugati poiché i fosfolipidi hanno un ruolo significativo nella trasduzione del segnale e nell'espressione genica. PEBPs sono stati originariamente identificati come una classe di proteine che specificamente si lega ai fosfolipidi PE. Due di questi proteine PEBP (PEBP-1 e -4) sono state identificate nell'uomo. PEBP -1, noto anche come RKIP, fu identificata per inibire Raf-1 nella cascata di segnalazione delle MAPK attraverso l'interazione con Raf-1.

In condizioni omeostatiche, PEBP1 si lega a Raf-1 e inibisce la segnalazione delle MAPK mediata da Raf-1 impedendo la fosforilazione di Raf-1.

La fosforilazione di PEBP1 sulla Ser153 da parte della proteina chinasi C (PKC) induce un cambiamento conformazionale nella tasca di legame del ligando e porta alla dissociazione del legame di PEBP1 a Raf-1 ed all'attivazione del pathway di MEK/ERK. La tasca può legare ligandi chimicamente distinti, compresi fosfolipidi e Raf-1, che competono per il legame di PEBP1 a Raf-1 e regolano le MAPK. La disregolazione di PEBPs contribuisce alla patogenesi di molte malattie, come l'Alzheimer, il diabete e il cancro.

Nel nostro studio dimostriamo che PEBP è, inoltre, importante modulatore di una delle chinasi, G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK-2), coinvolte nella desensibilizzazione delle G-protein coupled receptors, di cui fa parte il recettore β 2 adrenergico d'importanza cruciale nella terapia dell'asma. PEBP1 dissociato da Raf-1 e, preferenzialmente, legato a GRK-2 promuove e sostiene l'attivazione del recettore β 2- adrenergico, oltre all'attivazione di ERK. GRK-2 è un inibitore a feedback negativo delle GPCR che fosforila e attiva le GPCR, disaccoppiando il complesso proteina G-GPCR provocando, quindi, l'internalizzazione e il riciclaggio delle GPCR e inattivando la segnalazione delle proteine G.

Il β 2-AR è fosforilato dalla PKA o da chinasi specifiche delle proteine G (GRK) [79, 80, 81]. Il legame dell'agonista con il recettore porta ad un'immediata traslocazione dei GRKs dal citoplasma alla membrana ed alla successiva fosforilazione del recettore. Una volta ultimata la fosforilazione, la β -arrestina si lega al recettore, non permettendo più l'accoppiamento del recettore con la proteina Gs, limitando così la funzionalità recettoriale stessa. L'attivazione di altri recettori, che utilizzano cAMP come secondo messaggero, può indurre desensibilizzazione eterologa del recettore β 2-AR, a causa della formazione di cAMP e della successiva attivazione di PKA. La desensibilizzazione omologa, invece, è la risultante dell'attivazione combinata di PKA e GRK.

Il presente studio dimostra che IL-13 e ISO inducono fosforilazione del recettore β 2- adrenergico in seguito a stimolazione acuta e l'incremento della fosforilazione induce la desensibilizzazione e internalizzazione del recettore.

È interessante notare che tutti gli studi di PEBP1 e le sue interazioni con GRK - 2 ad oggi sono concentrati sulla capacità di PEBP1 di promuovere l'attivazione prolungata del recettore $\beta 2$, dovuta alla capacità di PEBP1, nella sua forma fosforilata, di legare GRK - 2 [116, 144].

In altre parole, PEBP1 è attivato, nelle cellule epiteliali bronchiali umane, conseguentemente all'esposizione a IL-13. La fosforilazione di PEBP1, indotta da IL-13, porta alla dissociazione di PEBP1 da Raf-1 ed all'attivazione del pathway di MEK/ERK. PEBP1 fosforilato è incrementato dopo 48 ore di stimolazione con IL-13.

Tuttavia, nessuno studio aveva ancora valutato l'effetto di elevati livelli intracellulari di 15LO1/15 HETE-PE su GRK -2. Abbiamo confermato che IL-13 induce elevati livelli di 15LO1 in cellule epiteliali bronchiali primarie e che, in presenza di elevati livelli di 15 LO1/15 HETE-PE, questa molecola compete con successo con GRK-2, anche in presenza di PEBP1 fosforilato.

A differenza di altre situazioni, 15 LO1/15 HETE -PE porterà all'incremento dell'attivazione di ERK e alla downregolazione dei GPCR, in particolare il $\beta 2$ AR.

Inoltre, questa risposta si verifica solo in cellule che producono 15LO1/15 HETE-PE (cellule epiteliali, monociti/macrofagi ed eosinofili), mentre le cellule muscolari lisce non si comportano nello stesso modo. Tuttavia, è ben noto che la segnalazione $\beta 2$ -AR in cellule epiteliali delle vie aeree è d'importanza fondamentale per la clearance mucociliare [145]. Il nostro studio, tramite esperimenti di co-immunoprecipitazione, ha dimostrato che il legame 15HETE-PE/15LO1 a PEBP1 efficacemente compete con il legame GRK-2, che porta a una maggiore fosforilazione/internalizzazione del $\beta 2$ -AR.

Lo studio dimostra che l'esposizione delle cellule epiteliali bronchiali umane a IL-13 induce incrementati livelli di 15LO1 e attivazione del pathway di ERK. Inoltre, l'inibizione di ALOX15 mediante siRNA mostra che l'attivazione è parzialmente dipendente dall'espressione di 15LO1 e che incrementati livelli di pERK sono correlati a incremento in 15LO1, suggerendo una correlazione tra i due pathway.

Nello studio abbiamo anche confermato l'interazione proteina-proteina tra PEBP1 and 15LO1, la cui interazione porta a rilascio di Raf-1 e attivazione di ERK in seguito a stimolazione acuta con IL-13.

Successivamente, abbiamo valutato l'implicazione biologica nella mancanza d'inibizione di GRK-2 sulla desensibilizzazione del β 2-AR in cellule primarie epiteliali bronchiali, dimostrando che la mancanza di inibizione di GRK-2 su PEBP1 nelle cellule in cui sono presenti elevati livelli di 15LO1 influisce sull'attività e sull'internalizzazione del recettore.

Brevemente, noi sosteniamo che il legame di 15LO1 a pPEBP1 e/o PEBP1 competitivamente inibisce il legame a GRK-2, così che GRK-2 rimane disponibile comportando il legame a β 2-AR con conseguente fosforilazione e down-regolazione del recettore stesso.

Noi crediamo che questo potrebbe avere un effetto in processi cellulari basilari, inclusi la funzione ciliare e la clearance mucosa. Dunque, 15LO1 attraverso attivazione e inibizione di molecole diverse incrementa la desensibilizzazione del recettore β 2. In particolare, 15LO1, in seguito a stimolazione con IL-13, si lega a PEBP1 competendo, quindi, con il sito di legame per GRK-2.

In seguito alla fosforilazione della Ser153 su PEBP1, questa piccola proteina si dissocia da Raf-1 e si lega, potenzialmente, a GRK-2. Questa combinazione di eventi porta all'attivazione di ERK e GPCR (in particolare del recettore β 2-adrenergico) per inibire efficacemente la capacità di GRK-2 di fosforilare e disattivare il recettore.

Abbiamo, anche, valutato l'impatto di IL-13 e ISO sulla forma fosforilata della proteina GRK-2 dimostrando che queste due molecole sono in grado di incrementare la quota di p-GRK-2.

L'incremento dell'attività di ERK potrebbe, di conseguenza, indurre fosforilazione di GRK-2, rilasciando in tal modo GRK-2 dalla membrana provocandone una riduzione della sua capacità di associarsi alle subunità β e γ della recettore β 2-adrenergico e, con un meccanismo a feedback positivo, indurre ulteriore desensibilizzazione del recettore.

Dunque, IL-13 e ISO inducono fosforilazione del recettore β 2-adrenergico tramite fosforilazione del GRK-2 inducendo, di conseguenza, la desensibilizzazione e internalizzazione del recettore.

L'attivazione del recettore β 2-AR comporta l'incremento intracellulare dei livelli di cAMP [73].

In una fase successiva dello studio, ci siamo proposti di valutare i livelli di cAMP negli stessi campioni dimostrando che il trattamento delle cellule epiteliali bronchiali primarie umane con IL-13 inibisce il rilascio di cAMP che è invece indotto dall'isoproterenolo, con conseguenti effetti sui meccanismi di broncodilatazione e di risoluzione dell'infiammazione.

Dunque, l'attivazione di β 2-AR promuove attivazione delle proteine G, incremento di cAMP e conseguente attivazione della proteina chinasi A (PKA). L'attivazione della PKA induce molti effetti intracellulari che contribuiscono al rilassamento della muscolatura liscia.

L'alterazione nella responsività dei β 2-AR può essere causata da mediatori infiammatori, glucocorticoidi e dagli stessi β agonisti, in modo tempo-dipendente e cellulo-specifica.

Noi dimostriamo che il trattamento delle cellule epiteliali bronchiali umane con un β 2 agonista a breve durata d'azione, quale l'ISO, comporta incremento intracellulare dei livelli di cAMP dopo appena 10 minuti di stimolazione. Il pretrattamento delle cellule con 30 minuti di esposizione al farmaco evidenzia un decremento nella risposta al rilascio di cAMP (circa il 20%) rispetto alla stimolazione con ISO per 10 minuti.

L'esposizione delle cellule ad un β 2 agonista causa, pertanto, la rapida attivazione delle proteine Gs e dell'adenilato ciclasi, con conseguente incremento nei livelli di cAMP.

Inoltre, il pretrattamento delle cellule con IL-13 per 48 ore provoca una diminuzione nei livelli di cAMP di circa il 50% sia nella condizione in cui il farmaco è stato aggiunto per soli 10 minuti sia nella condizione in cui le cellule sono state trattate con ISO per 30 minuti più ulteriori 10.

Ciò dimostra che elevati livelli di IL-13 inibiscono il rilascio di cAMP intracellulare altrimenti indotto dall'ISO, portando ad una rapida desensibilizzazione del recettore β 2 adrenergico con conseguenti effetti sui meccanismi di broncodilatazione e di risoluzione dell'infiammazione.

Ulteriori esperimenti hanno invece dimostrato il coinvolgimento di 15LO1 nel rilascio di cAMP.

L'inibizione di 15LO1 mediante trasfezione e la stimolazione con IL-13 e ISO delle cellule epiteliali bronchiali primarie in colture ALI hanno dimostrato il coinvolgimento di 15LO1 nel

rilascio di cAMP intracellulare. Possiamo affermare che la trasfezione di ALOX15 induce decremento nella sintesi della proteina 15LO1, il cui silenziamento comporta incremento nel rilascio di cAMP dimostrando il suo coinvolgimento nella regolazione dei meccanismi di desensibilizzazione e di risposta ai farmaci β 2 agonisti.

In conclusione, nel presente studio, abbiamo identificato un nuovo ruolo dell'infiammazione mediata dall'IL-13 in pazienti affetti da asma severo, mettendo in evidenza che la suddetta interleuchina svolge un ruolo significativo nella desensibilizzazione del β 2-AR contribuendo alla ridotta risposta ai farmaci β 2 long acting utilizzati nel trattamento farmacologico dell'asma bronchiale. Inoltre, abbiamo identificato che questo meccanismo di desensibilizzazione dei recettori beta2 mediato da IL-13 in cellule epiteliali primarie umane, di soggetti asmatici e normali, coinvolge nuovi pathway cellulari strettamente regolati dall'attività ERK. L'ulteriore comprensione delle interazioni dei meccanismi intracellulari coinvolte nella desensibilizzazione dei recettori dei farmaci beta2 long acting potrebbe essere la base per l'identificazione di nuovi approcci terapeutici nel trattamento farmacologico dell'asma severo.

Bibliografia

1. GINA Workshop Report (Updated 2012). Global strategy for asthma management and prevention. National Institute of Health; National Heart, Lung and Blood Institute. U.S.A.
2. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. SE Wenzel. Review. Nat Med. 2012 May 4;18(5):716-25
3. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. Allergy 2004;59(5):469-478.
4. Beasley R. The Global Burden of Asthma Report, Global Initiative for Asthma (GINA). Available from <http://www.ginasthma.org> 2004.
5. Saint –Pierre P, Bourdin A, Chanez P, Daures JP, Godard P. Are overweight asthmatics more difficult to control? Allergy 2006; 61(1): 79-84.
6. Luppi F, De Guglielmo M, Fabbri L.M. Fattori di rischio dell'asma bronchiale. In: Rapporto sull'Asma 2001. De Palma M, Fabbri L.M, Grassi C eds, Sintagma Publ, Milano, 2001, pp 47-68.
7. Saglani S, Bush A. Early-life origins of asthma, Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology 2007, 7:83-90.
8. Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggemann B, Grüber G, Wahn U. Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. Lancet 2006; 368:763-70
9. Holloway JW, Beghe B, Holgate ST. The genetic basis of atopic asthma. Clin Exp Allergy 1999;29(8):1023-1032.
10. Wiesch DG, Meyers DA, Bleecker ER. Genetics of asthma. J Allergy Clin Immunol 1999;104(5):895-901.)
11. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. BMJ 1989;299(6710):1259-1260.
12. Israel E, Chinchilli VM, Ford JG, Boushey HA, Cherniack R, Craig TJ, Deykin A, Fagan JK, Fahy JV, Fish J, Kraft M, Kunselman SJ, Lazarus SC, Lemanske RF, Jr., Liggett SB, Martin RJ, Mitra N, Peters SP, Silverman E, Sorkness CA, Szeffler SJ, Wechsler ME, Weiss ST, Drazen JM. Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. Lancet 2004;364(9444):1505-1512.

13. Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(3):522-543.
14. In KH, Asano K, Beier D, Grobholz J, Finn PW, Silverman EK, Silverman ES, Collins T, Fischer AR, Keith TP, Serino K, Kim SW, De Sanctis GT, Yandava C, Pillari A, Rubin P, Kemp J, Israel E, Busse W, Ledford D, Murray JJ, Segal A, Tinkleman D, Drazen JM. Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription. *J Clin Invest* 1997;99(5):1130-1137.
15. Tattersfield AE, Hall IP. Are beta2-adrenoceptor polymorphisms important in asthma--an unraveling story. *Lancet* 2004;364(9444):1464-1466.
16. Nowen A, Freeston MH, Labbe R, Boulet LP. Phsicological factors associated with emergency room visits among asthmatic patients. *Behav Modif* 1999; 23:217-22.
17. Gern GS, Busse WW. Association of rhinovirus infections and asthma. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:9-18.
18. Clark JC, Cochrane LM. Physical activity and asthma. *Curr Opin Pulm Med* 1999; 5:68-75.
19. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(5):1720-1745.
20. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005;23:749-786.
21. Akbari O, Faul JL, Hoyte EG, Berry GJ, Wahlstrom J, Kronenberg M, DeKruyff RH, Umetsu DT. CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 2006;354(11):1117- 1129.
22. Kuipers H, Lambrecht BN. The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Curr Opin Immunol* 2004;16(6):702-708.
23. Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF, Gibson PG, George SC, Grasemann H, et al. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. *Chest*.2010 Sep;138(3):682-92).
24. Leff AR. Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy. *Annu Rev Med* 2001;52:1-14.

25. Hirst SJ, Martin JG, Bonacci JV, Chan V, Fixman ED, Hamid QA, Herszberg B, Lavoie JP, McVicker CG, Moir LM, Nguyen TT, Peng Q, Ramos-Barbon D, Stewart AG. Proliferative aspects of airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(2 Suppl):S2-17.
26. Black JL. Asthma--more muscle cells or more muscular cells? *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169(9):980-981.
27. McParland BE, Macklem PT, Pare PD. Airway wall remodeling: friend or foe? *J Appl Physiol* 2003;95(1):426-434.
28. Bel EH. Clinical phenotypes of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2004;10:44-50.
29. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006;368:804-13.
30. Berry M, Morgan A, Shaw DE, Parker D, Green R, Brightling C, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and noneosinophilic asthma. *Thorax* 2007;62:1043-9.
31. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Noneosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet* 1999;353:2213-4.
32. Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:64-72.
33. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology* 2006;11:54-61.
34. van Veen IH, Ten Brinke A, Gauw SA, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Consistency of sputum eosinophilia in difficult-to-treat asthma: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:615-7, 61 e1-2.
35. Juniper EF, Kline PA, Vanzielegheem MA, Ramsdale EH, O'Byrne PM, Hargreave FE. Effect of long-term treatment with an inhaled corticosteroid (budesonide) on airway hyperresponsiveness and clinical asthma in nonsteroid-dependent asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1990;142(4):832-6.
36. The Childhood Asthma Management Program Research Group. Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. *N Engl J Med* 2000;343(15):1054-63.
37. Jeffery PK, Godfrey RW, Adelroth E, Nelson F, Rogers A, Johansson SA. Effects of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticular

- collagen in asthma. A quantitative light and electron microscopic study. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(4 Pt 1):890-9.
38. Pauwels RA, Lofdahl CG, Postma DS, Tattersfield AE, O'Byrne P, Barnes PJ, et al. Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group. *N Engl J Med* 1997;337(20):1405-11.
 39. Suissa S, Ernst P, Benayoun S, Baltzan M, Cai B. Low-dose inhaled corticosteroids and the prevention of death from asthma. *N Engl J Med* 2000;343(5):332-6.
 40. Waalkens HJ, Van Essen-Zandvliet EE, Hughes MD, Gerritsen J, Duiverman EJ, Knol K, et al. Cessation of long-term treatment with inhaled corticosteroid (budesonide) in children with asthma results in deterioration. The Dutch CNSLD Study Group. *Am Rev Respir Dis* 1993;148(5):1252-7.
 41. Jayasiri B, Perera C. Successful withdrawal of inhaled corticosteroids in childhood asthma. *Respirology* 2005;10:385-8.
 42. Dicpinigaitis PV, Dobkin JB, Reichel J. Antitussive effect of the leukotriene receptor antagonist zafirlukast in subjects with cough-variant asthma. *J Asthma* 2002;39(4):291-7.
 43. Lipworth BJ. Leukotriene-receptor antagonists. *Lancet* 1999;353(9146):57-62.
 44. Drazen JM, Israel E, O'Byrne PM. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N Engl J Med* 1999;340(3):197-206.
 45. Barnes NC, Miller CJ. Effect of leukotriene receptor antagonist therapy on the risk of asthma exacerbations in patients with mild to moderate asthma: an integrated analysis of zafirlukast trials. *Thorax* 2000;55(6):478-83.
 46. Noonan MJ, Chervinsky P, Brandon M, Zhang J, Kundu S, McBurney J, et al. Montelukast, a potent leukotriene receptor antagonist, causes dose-related improvements in chronic asthma. Montelukast Asthma Study Group. *Eur Respir J* 1998;11(6):1232-9.
 47. Reiss TF, Chervinsky P, Dockhorn RJ, Shingo S, Seidenberg B, Edwards TB. Montelukast, a once-daily leukotriene receptor antagonist, in the treatment of chronic asthma: a multicenter, randomized, doubleblind trial. Montelukast Clinical Research Study Group. *Arch Intern Med* 1998;158(11):1213-20.

48. Leff JA, Busse WW, Pearlman D, Bronsky EA, Kemp J, Hendeles L, et al. Montelukast, a leukotriene receptor antagonist, for the treatment of mild asthma and exercise-induced bronchoconstriction. *N Engl J Med* 1998;339(3):147-52.
49. Dahlen B, Nizankowska E, Szczeklik A, Zetterstrom O, Bochenek G, Kumlin M, et al. Benefits from adding the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton to conventional therapy in aspirin-intolerant asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157 (4 Pt 1):1187-94.
50. Bleecker ER, Welch MJ, Weinstein SF, Kalberg C, Johnson M, Edwards L, et al. Low-dose inhaled fluticasone propionate versus oral zafirlukast in the treatment of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(6 Pt 1):1123-9.
51. Laviolette M, Malmstrom K, Lu S, Chervinsky P, Pujet JC, Peszek I, et al. Montelukast added to inhaled beclomethasone in treatment of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(6):1862-8.
52. Lofdahl CG, Reiss TF, Leff JA, Israel E, Noonan MJ, Finn AF, et al. Randomised, placebo controlled trial of effect of a leukotriene receptor antagonist, montelukast, on tapering inhaled corticosteroids in asthmatic patients. *BMJ* 1999;319(7202):87-90.
53. Virchow JC, Prasse A, Naya I, Summerton L, Harris A. Zafirlukast improves asthma control in patients receiving high-dose inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(2 Pt 1):578-85.
54. Price DB, Hernandez D, Magyar P, Fiterman J, Beeh KM, James IG, et al. Randomised controlled trial of montelukast plus inhaled budesonide versus double dose inhaled budesonide in adult patients with asthma. *Thorax* 2003;58(3):211-6.
55. Vaquerizo MJ, Casan P, Castillo J, Perpina M, Sanchis J, Sobradillo V, et al. Effect of montelukast added to inhaled budesonide on control of mild to moderate asthma. *Thorax* 2003;58(3):204-10.
56. Bjermer L, Bisgaard H, Bousquet J, Fabbri LM, Greening AP, Haahtela T, et al. Montelukast and fluticasone compared with salmeterol and fluticasone in protecting against asthma exacerbation in adults: one year, double blind, randomised, comparative trial. *BMJ* 2003;327(7420):891.
57. Nelson HS, Busse WW, Kerwin E, Church N, Emmett A, Rickard K, et al. Fluticasone propionate/salmeterol combination provides more effective asthma control than low-

- dose inhaled corticosteroid plus montelukast. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(6):1088-95.
58. Lemanske RF, Jr., Sorkness CA, Mauger EA, Lazarus SC, Boushey HA, Fahy JV, et al. Inhaled corticosteroid reduction and elimination in patients with persistent asthma receiving salmeterol: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;285(20):2594-603.
 59. Lazarus SC, Boushey HA, Fahy JV, Chinchilli VM, Lemanske RF, Jr., Sorkness CA, et al. Long-acting beta2-agonist monotherapy vs continued therapy with inhaled corticosteroids in patients with persistent asthma: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;285(20):2583-93.
 60. Gibson PG, Powell H, Ducharme FM. Differential effects of maintenance long-acting beta-agonist and inhaled corticosteroid on asthma control and asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2007 Feb;119(2):344-50.
 61. Pearlman DS, Chervinsky P, LaForce C, Seltzer JM, Southern DL, Kemp JP, et al. A comparison of salmeterol with albuterol in the treatment of mild-to- moderate asthma. *N Engl J Med* 1992;327(20):1420-5.
 62. Kesten S, Chapman KR, Broder I, Cartier A, Hyland RH, Knight A, et al. A three-month comparison of twice daily inhaled formoterol versus four times daily inhaled albuterol in the management of stable asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991;144 (3 Pt 1):622-5.
 63. Wenzel SE, Lumry W, Manning M, Kalberg C, Cox F, Emmett A, et al. Efficacy, safety, and effects on quality of life of salmeterol versus albuterol in patients with mild to moderate persistent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;80(6):463-70.
 64. Pauwels RA, Lofdahl CG, Postma DS, Tattersfield AE, O'Byrne P, Barnes PJ, et al. Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group. *N Engl J Med* 1997;337(20):1405-11.)
 65. Shrewsbury S, Pyke S, Britton M. Meta-analysis of increased dose of inhaled steroid or addition of salmeterol in symptomatic asthma (MIASMA). *BMJ* 2000;320(7246):1368-73.
 66. Woolcock A, Lundback B, Ringdal N, Jacques LA. Comparison of addition of salmeterol to inhaled steroids with doubling of the dose of inhaled steroids. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(5):1481-8.

67. Greening AP, Ind PW, Northfield M, Shaw G. Added salmeterol versus higher-dose corticosteroid in asthma patients with symptoms on existing inhaled corticosteroid. Allen & Hanburys Limited UK Study Group. *Lancet* 1994;344(8917):219-24.
68. Newnham DM, McDevitt DG, Lipworth BJ. Bronchodilator subsensitivity after chronic dosing with formoterol in patients with asthma. *Am J Med* 1994;97(1):29-37. 74.
69. Bleecker ER, Postma DS, Lawrance RM, Meyers DA, Ambrose HJ, Goldman M. Effect of ADRB2 polymorphisms on response to long-acting beta2-agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies. *Lancet* 2007 Dec 22;370(9605):2118-25.
70. Kobilka B.K., Dixon R.A., Frielle H.G., Dohlman M.A., Bolanowski I., Sigal I.S. cDNA for the human β 2 adrenergic receptor: a protein with multiple spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of a receptor for platelet growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:46-50.
71. Johnson M. Molecular mechanisms of β 2-adrenergic receptor function, response and, regulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jan; 117:18-24.
72. O'Dowd B.F., Hnatowich M., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Bouvier M. Palmitoylation of the human b2-adrenergic receptor: mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem* 1989;164:7564-7569.
73. Robison G.A., Butcher R.W., Sutherland E.W. Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1967; 319:703-723.
74. Maskrey BH, Bermudez-Fajardo A, Morgan AH, Stewart-Jones E, Dioszeghy V, Taylor GW, Baker PR, Coles B, Coffey MJ, Kuhn H, et al. Activated platelets and monocytes generate four hydroxyphosphatidylethanolamines via lipoxygenase. *J Biol Chem* 2007;282: 20151–20163.
75. Daaka Y., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J. Switching of the coupling of the adrenergic receptor to different G-proteins by protein kinase A. *Nature* 1997; 390:88-91.
76. Roth M., Johnson P.R., Rüdiger J.J., King G.G., Ge Q., Burgess J.K., Anderson G., Tamm M., Black J.L. Interaction between glucocorticoids and beta2-agonists on bronchial airway smooth muscle cells through synchronised cellular signalling. *Lancet* 2002; 360:1293-1299.

77. Roth M., Johnson PR, Rüdiger JJ, King GG, Ge Q, Burgess JK, Anderson G, Tamm M, Black JL. Interaction between glucocorticoids and beta2 agonists on bronchial airway smooth muscle cells through synchronised cellular signalling. *Lancet* 2002; 360:1293-12939.
78. Rüdiger J.J., Roth M., Bihl M.P. Glucocorticoids act through a C/EBP- α - glucocorticoid receptor complex. *FASEB J* 2002; 16:177–84.
79. Bouvier M., Collins S., O'Dowd B.F., Campbell P.T., Deblasi A., Kobilka B.K., MacGregor C., Irons G.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J. Two distinct pathways for cAMPmediated downregulation of the beta2-adrenergic receptor: phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA levels. *J. Biol. Chem* 1989; 264:16786-16792.
80. Bouvier M., Hausdorff W.P., DeBlasi A., O'Dowd B.F., Kobilka B.K., Caron M.G., Lefkowitz, R. Removal of phosphorylation sites from the beta-2-adrenergic receptor delays the onset of agonist promoted desensitization. *Nature* 1988; 333:370-373.
81. Hausdorff W.P., Bouvier, M., O'Dowd, B.F., Irons, G.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 1989. Phosphorylation sites on two domains of the beta2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem* 1989. 264:12657-12 665.
82. Goodman O.B.J., Krupnick J.G., Gurevich V.V., Benovic J.L., Keen J.H. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J. Biol. Chem* 1997. 279:15017-15022.
83. Laporte J.D., Moore P.E., Abraham J.H., Maksym G.N., Fabry B., Panettieri R.A., Shore S.A. Role of ERK MAP kinases in responses of cultured human airway smooth muscle cells to IL-1beta. *Am. J. Physiol* 1999; 277:943-951.
84. Laporte J.D., Moore P.E., Lahiri T., Schwartzman I.N., Panettieri R.A., Shore S.A. p38 MAP kinase regulates IL-1 beta responses in cultured airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 2000; 279:932-941.
85. Campbell P.T., Hnatowich M., O'Dowd B.F., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Hausdorff W.P., 1991. Mutations of the human beta 2-adrenergic receptor that impair coupling to Gs interfere with receptor down-regulation by not sequestration. *Mol. Pharmacol* 1991; 39:192-198.

86. Barak L.S., Tiberi M., Freedman N.J., Kwatra M.M., Lefkowitz R.J., Caron M.G. A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated beta-2-adrenergic receptor sequestration. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:2790-2795.
87. Hadcock J.R., Malbon C.C. Down-regulation of betaadrenergic receptors: agonist induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988. 85:5021-5025.
88. Grandordy B.M., Mak J.C., Barnes P.J. Modulation of airway smooth muscle beta-adrenoceptor function by a muscarinic agonist. *Life Sci* 1994. 54:185-191.
89. Shore S.A., Laporte J., Hall I.P., Hardy E., Panettieri R.A. Effect of IL-1 beta on responses of cultured human airway smooth muscle cells to bronchodilator agonists. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1997; 16:702-712.
90. Laporte J.D., Moore P.E., Panettieri R.A., Moeller W., Heyder J., Shore S.A. Prostanoids mediate IL-1beta-induced beta-adrenergic hyporesponsiveness in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol* 1998; 275:491-501.
91. Pang L., Holland E., Knox A.J., 1998a. Impaired cAMP production in human airway smooth muscle cells by bradykinin: role of cyclooxygenase products. *Am. J. Physiol* 1998; 275:322-329.
92. Pascual R.M., Billington C.K., Hall I.P., Panettieri R.A., Fish J.E., Peters S.P., Penn R.B. Mechanisms of cytokine effects on G protein-coupled receptor- mediated signaling in airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 2001; 281:1425-1435.
93. Morcillo EJ, Cortijo J. Mucus and MUC in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2006;12:1–6.
94. Fahy JV. Goblet cell and mucin gene abnormalities in asthma. *Chest* 2002;122:320S–326S.
95. Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu Rev Physiol* 2008;70: 459–486.
96. Rose MC, Nickola TJ, Voynow JA. Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:533–537.
97. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006;86:245– 278.

98. Chu HW, Balzar S, Seedorf GJ, Westcott JY, Trudeau JB, Silkoff P, Wenzel SE. Transforming growth factor-beta2 induces bronchial epithelial mucin expression in asthma. *Am J Pathol* 2004;165:1097–1106.
99. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999;103:779–788.
100. Fulkerson PC, Fischetti CA, Hassman LM, Nikolaidis NM, Rothenberg ME. Persistent effects induced by IL-13 in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:337–346.
101. Chu HW, Balzar S, Westcott JY, Trudeau JB, Sun Y, Conrad DJ, Wenzel SE. Expression and activation of 15-lipoxygenase pathway in severe asthma: relationship to eosinophilic phenotype and collagen deposition. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1558–1565.
102. Bradding P, Redington AE, Djukanovic R, Conrad DJ, Holgate ST. 15-lipoxygenase immunoreactivity in normal and in asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1201–1204.
103. Kim KS, Chun HS, Yoon JH, Lee JG, Lee JH, Yoo JB. Expression of 15-lipoxygenase-1 in human nasal epithelium: its implication in mucociliary differentiation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;73:77–83.
104. Profita M, Sala A, Riccobono L, Paterno A, Mirabella A, Bonanno A, Guerrera D, Pace E, Bonsignore G, Bousquet J, et al. 15-lipoxygenase expression and 15(s)-hydroxyeicoisatetraenoic acid release and reincorporation in induced sputum of asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:711–716.
105. Kumlin M, Hamberg M, Granstrom E, Bjorck T, Dahlen B, Matsuda H, Zetterstrom O, Dahlen SE. 15(s)-hydroxyeicosatetraenoic acid is the major arachidonic acid metabolite in human bronchi: association with airway epithelium. *Arch Biochem Biophys* 1990;282:254–262.
106. Brown CD, Kilty I, Yeadon M, Jenkinson S. Regulation of 15-lipoxygenase isozymes and mucin secretion by cytokines in cultured normal human bronchial epithelial cells. *Inflamm Res* 2001;50:321–326.

107. Jayawickreme SP, Gray T, Nettesheim P, Eling T. Regulation of 15- lipxygenase expression and mucus secretion by IL-4 in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 1999;276:L596–L603.
108. Maskrey BH, Bermudez-Fajardo A, Morgan AH, Stewart-Jones E, Dioszeghy V, Taylor GW, Baker PR, Coles B, Coffey MJ, Kuhn H, et al. Activated platelets and monocytes generate four hydroxyphosphatidylethanolamines via lipxygenase. *J Biol Chem* 2007;282: 20151–20163.
109. Bernier, I., Tresca, J. P., and Jollès, P. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 871, 19–23.
110. Vallée, B. S., Tauc, P., Brochon, J. C., Maget-Dana, R., Lelièvre, D., Metz-Boutigue, M. H., Bureaud, N., and Schoentgen, F. (2001) *Eur. J. Biochem.* 268, 5831–5841.
111. Wang X, Li N, Liu B, et al. A novel human phosphatidylethanolamine-binding protein resists tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathway activation and phosphatidylethanolamine externalization. *J Biol Chem* 2004;279(44):45855-64.
112. Yeung K, Seitz T, Li S, et al. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 1999;401(6749):173-7.
113. Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K. D., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M., and Kolch, W. (1999) *Nature* 401, 173.
114. Yeung, K. C., Rose, D. W., Dhillon, A. S., Yaros, D., Gustafsson, M., Chatterjee, D., McFerran, B., Wyche, J., Kolch, W., and Sedivy, J. M. (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21, 7207–7217
115. Al-Mulla, F., Bitar, M. S., Al-Maghrebi, M., Behbehani, A. I., Al-Ali, W., Rath, O., Doyle, B., Tan, K. Y., Pitt, A., and Kolch, W. (2011) *Cancer Res.* 71, 1334–1343
116. Lorenz, K., Lohse, M. J., and Quitterer, U. (2003) *Nature* 426, 574–579
117. Krosiak, T. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 39772–39778)
118. Granovsky, A. E., and Rosner, M. R. (2008) *Cell Res.* 18, 452-457
119. Serre, L., Pereira de Jesus, K., Zelwer, C., Bureaud, N., Schoentgen, F., and Bénédicti, H. (2001) *J. Mol. Biol.* 310, 617–634
120. Granovsky, A. E., Clark, M. C., McElheny, D., Heil, G., Hong, J., Liu, X., Kim, Y., Joachimiak, G., Joachimiak, A., Koide, S., and Rosner, M. R. (2009) *Mol. Cell. Biol.* 29, 1306–1320.

121. Serre, L., Vallée, B., Bureau, N., Schoentgen, F., and Zelwer, C. (1998) *Structure* 6, 1255–1265
122. Shemon, A. N., Heil, G. L., Granovsky, A. E., Clark, M. M., McElheny, D., Chimon, A., Rosner, M. R., and Koide, S. (2010) *PLoS ONE* 5, e1047910 Downloaded from www.jbc.org by guest, on May 28, 2012 Dimerization controls target specificity of RKIP
123. Rath, O., Park, S., Tang, H.-H., Banfield, M. J., Brady, R. L., Lee, Y. C., Dignam, J. D., Sedivy, J. M., Kolch, W., and Yeung, K. C. (2008) *Cell. Signal.* 20, 935–941
124. Yeung, K., Janosch, P., McFerran, B., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M., and Kolch, W. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20, 3079–3085.
125. Granovsky, A. E., and Rosner, M. R. (2008) *Cell Res.* 18, 452–457 , 19 --- 19. Banfield, M. J., and Brady, R. L. (2000) *J. Mol. Biol.* 297, 1159–1170
126. Granovsky, A. E., Rosner, M. R. (2008), *Cell Res.* 18, 452-457)
127. Lorenz, K., Schmitt, J. P., Vidal, M., and Lohse, M. J. (2009) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 41, 2351-2355
128. Maurer, G., Tarkowski, B., and Baccarini, M. (2011) *Oncogene* 30, 3477–3488)
129. Zeng, L., Imamoto, A., and Rosner, M. R. (2008) *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 1275–1287
130. Keller, E. T., Fu, Z., Yeung, K., and Brennan, M. (2004) *Cancer Lett.* 207, 131–137
131. Pierce, K. L., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 639–650
132. Klysik J, Theroux SJ, Sedivy JM, Moffit JS, Boekelheide K. Signaling crossroads: the function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction. *Cell Signal* 2008;20(1):1-9.
133. Granovsky AE, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein: a signal transduction modulator and metastasis suppressor. *Cell Res* 2008;18(4):452-7.
134. Trakul N, Rosner MR. Modulation of the MAP kinase signaling cascade by Raf kinase inhibitory protein. *Cell Res* 2005;15(1):19-23.
135. Granovsky AE, Clark MC, McElheny D, et al. Raf kinase inhibitory protein function is regulated via a flexible pocket and novel phosphorylation-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 2009;29(5):1306-20.

136. Lorenz K, Lohse MJ, Quitterer U. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* 2003;426(6966):574-9.
137. Wenzel SE, Busse WW; National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program (2007) Severe asthma: Lessons from the Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 119:14–21, quiz 22–23.
138. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 2003;8:432–446.
139. Bishop AE. Pulmonary epithelial stem cells. *Cell Prolif* 2004;37:89–96.
140. Rawlins EL, Hogan BL. Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development* 2006;133:2455–2465.
141. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:772–777.
142. Nelson HS, Weiss ST, Bleecker ER, Yancey SW, Dorinsky PM. The Salmeterol Multicenter Asthma Research Trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol. *Chest* 2006;129(1):15-26.
143. Giembycz MA, Newton R. Beyond the dogma: novel beta2-adrenoceptor signalling in the airways. *Eur Respir J* 2006;27(6):1286-306.
144. Huang J, Mahavadi S, Sriwai W, Grider JR, Murthy KS. Cross-regulation of VPAC(2) receptor desensitization by M(3) receptors via PKC-mediated phosphorylation of RKIP and inhibition of GRK2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292(3):G867-74.
145. Lindberg S, Khan R, Runer T. The effects of formoterol, a long-acting beta 2-adrenoceptor agonist, on mucociliary activity. *Eur J Pharmacol* 1995;285(3):275-80.
146. Zhao J, Maskrey B, Balzar S, Chibana K, Mustovich A, Hu H, Trudeau JB, O'Donnell V, Wenzel SE. Interleukin-13-induced MUC5AC is regulated by 15-lipoxygenase 1 pathway in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 May 1;179(9):782-90.